ARCHIVES ROUMAINES
DE PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
ET DE MICROBIOLOGIE

TOME 20 No. 3 SEPTEMBRE 1961

LA RÉSISTANCE SPÉCIFIQUE CONFÉRÉE PAR LA VACCINATION ANTITYPHOPARATYPHOÏDIQUE, COMPARÉE À L'ÉTAT D'IMMUNITÉ DES ANCIENS MALADES DE FIÈVRE TYPHOÏDE, CRITÉRIUMS D'APPRÉCIATION DE L'EFFICACITÉ DU VACCIN T.A.B.

par

N. Nestoresco
(Institut « Dr. I. Cantacuzino »)

T. Grigoriu, Elisabeta Bădulesco, I. Solomon, A. Barbu, Ecaterina Vasiliu, Maria Ionesco
(Section de Bactériologie du Centre Sanitaire antiépidémique de Bucarest)

A. Calomfiresco, P. Bordeianu, Gh. Alesseanu et Gh. Panaitesco
(Section d'Epidémiologie du Centre Sanitaire antiépidémique de Bucarest)

— Manuscrit reçu le 12 mars 1961 —

Le problème concernant le degré et la durabilité de la protection conférée par les vaccins microbiens à l'homme n'a pas encore trouvé sa solution, qui dépend d'une série de facteurs, dont nous rappelons:

a) l'impossibilité d'appliquer à l'homme les tests de virulence ou d'immunité afin d'apprécier cette protection;

b) le manque, dans certains cas, d'animaux sensibles aux germes contre lesquels ces vaccins sont préparés;

c) l'utilisation de certaines méthodes de laboratoire qui augmentent la virulence des germes spécifiques dans l'infection expérimentale, ce qui nous éloigne beaucoup de l'appréciation réelle de l'efficience du vaccin;

d) l'emploi concomitant de tests d'immunité — le plus souvent non-concordants entre eux — qui à présent ne sont plus considérés sans réserve comme des critériums valables pour l'estimation du pouvoir immunisant de pareils produits vaccinants, etc.

D'ailleurs, toutes ces difficultés, montrées et discutées avec beaucoup de compétence au II-e Congrès International de Standardisation Immunobiologique, qui a eu lieu à Rome en 1958, ainsi que les recommandations d'encourager les études concernant le contrôle et l'efficience des vaccins microbiens, prouvent une fois de plus combien ce problème est épineux du point de vue pratique.

La question de la standardisation, du contrôle et de l'efficience des vaccins contre la fièvre typhoïde et les fièvres paratyphoïdiques restent actuelles, bien

que l'immunisation contre la fièvre typhoïde soit pratiquée depuis plus de 50 ans. En général, la majorité des auteurs sont d'accord que les vaccins typho-paratyphoïdiques ont démontré leur valeur protectrice (1, 2, 3, 4, 7).

Les critiques apportées ces derniers temps par RAETTIG et d'autres auteurs, qu'il cite en sa faveur (6,14), sur l'efficience du vaccin T.A.B. se réfèrent, en fait, aux aspects épidémiologiques particuliers, qui dépassent la limite de l'efficience usuelle de n'importe quel vaccin typho-paratyphoïdique.

Jusqu'à présent, l'étude des méthodes de travail en ce qui concerne la standardisation et surtout le contrôle et l'efficience des vaccins T.A.B., a permis une série de conclusions, parmi lesquelles:

— le test épidémiologique, qui reflète fidèlement l'efficience des vaccins, reste le test d'élection; c'est à ce test que l'Organisation Mondiale de la Santé et les experts yougoslaves réunis ont eu recours dans l'étude effectuée en 1955 sur l'efficience des préparations vaccinantes T.A.B., dans la ville et le district Osijek de Yougoslavie (5, 10, 12, 13).

Le test épidémiologique, bien qu'idéal, est malheureusement impropre à appliquer aux lots de fabrication des vaccins, à cause de la durée nécessaire à la poursuite des résultats et du fait que l'organisation d'un pareil contrôle est particulièrement coûteuse.

— d'autre part, les tests de laboratoire n'offrent pas encore des possibilités assez larges pour l'estimation de l'efficience réelle des vaccins, similaires à ceux utilisés à présent pour les préparations antitoxiques. Bien que nombreux, les différents tests de laboratoire proposés ont été soumis à des critiques sévères, dont on a déduit:

a) les méthodes « in vitro » selon les différentes recherches effectuées se sont montrées incapables d'exprimer les propriétés immunogènes réelles du vaccin T.A.B.;

b) les méthodes « in vivo » en tant que test de protection active de la souris, ou test de protection passive, utilisant le sérum de lapin immunisé avec le vaccin à examiner, et particulièrement ce dernier, sont considérées à présent comme les critériums les plus objectifs pour l'appréciation de la valeur des vaccins typho-paratyphoïdiques (9).

A leur tour, ces méthodes, ont été également critiquées: d'abord parceque leur répétition sur un même vaccin offre des résultats parfois différents; en second lieu — étant donné que le lapin est un animal qui ne fait pas spontanément la fièvre typhoïde — le sérum des lapins immunisés avec un vaccin typho-paratyphoïdique n'offre probablement pas toutes les propriétés d'un sérum d'homme, immunisé par vaccination ou naturellement par la maladie.

Pour les raisons exposées et afin d'obtenir les données les plus proches de la réalité sur la protection spécifique conférée par la vaccination typho-paratyphoïdique chez l'homme, nous nous sommes proposé d'étudier la résistance spécifique envers la fièvre typhoïde au sein de la population d'une grande ville, où annuellement on signale un grand nombre d'infections et qui a été vaccinée de manière soutenue contre cette maladie.

Afin d'apprécier le degré et la durée de l'état de résistance, nous nous sommes adressés à des groupes sélectionnés de personnes vaccinées au vaccin T.A.B., par comparaison avec des personnes immunisées par la maladie (anciens malades

de fièvre typhoïde confirmés bactériologiquement). A cette occasion, on a vérifié une fois de plus la valeur des tests « in vitro » et « in vivo », utilisés actuellement pour l'appréciation de l'efficience du vaccin T.A.B., en cherchant les éventuelles améliorations des méthodes de travail.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La recherche a été effectuée dans la ville de B., qui a un fond endémique diminué de fièvre typhoïde, des possibilités suffisantes d'hospitalisation de tous les cas déclarés et dans laquelle on réalise un contrôle rigoureux et périodique de l'état de porteur des anciens malades.

L'étude a compris 568 personnes, réparties comme suit:

A. — *Lot No. 1*: 60 sujets qui n'avaient pas eu la fièvre typhoïde et n'avaient jamais été vaccinés contre cette maladie. Ce lot a été examiné en ce qui concerne la présence des agglutinines antityphiques dans le sérum (agglutinines « H », « O » et « Vi »), ainsi que la capacité fixatrice et protectrice. Après avoir effectué ces réactions sérologiques, on a fait la vaccination anti-typho-paratyphoïdique par 3 inoculations de vaccin, (voie souscutanée), à 7 jours d'intervalle, avec 0,5 ml, 1 ml et 1 ml. Six mois après la vaccination, 30 personnes de ce lot (constituant le *lot 1a)* ont été soumises aux mêmes examens sérologiques.

Lot No. 2: 101 personnes complètement vaccinées, dans les conditions montrées plus haut, une année auparavant.

Lot No. 3: 122 personnes complètement vaccinées deux années auparavant, qui avaient reçu une inoculation de rappel avec 1 ml vaccin, une année après la vaccination.

Lot No. 4: 95 personnes complètement vaccinées 3 années auparavant, ayant reçu l'inoculation de rappel (1 ml), pendant 2 années consécutives.

Lot No. 5: 54 anciens malades de fièvre typhoïde, excréteurs persistants de *S. typhi*, par les matières fécales.

Lot No. 6: 136 anciens malades de fièvre typhoïde, non-porteurs.

Les lots 5 et 6 ont constitué les témoins pour apprécier la résistance spécifique des personnes vaccinées dans les conditions mentionnées.

Le tableau I représente l'intervalle de temps écoulé entre la période d'infection et le moment de leur examination.

Tableau I

Anciens malades	Période écoulée entre l'infection et le moment de l'examen												Total
Lots	6 mois	1 an	2 ans	3 ans	4 ans	5 ans	6 ans	7 ans	8 ans	9 ans	10 ans	11 ans	
5	3	8	6	3	3	5	4	5	3	1	0	13	54
6	0	8	21	20	24	21	13	11	11	1	1	5	136

Dans le tableau II, nous présentons la répartition par sexe, âge et occupation des 6 lots étudiés.

Tableau II

Lots	Sexe		Age					Occupation	
	M	F	10—14 ans	15—20 ans	21—30 ans	31—40 ans	au-dessus de 40 ans	élèves	ouvriers
1	33	27	34	25	1	0	0	59	1
1 a.	11	19	30	0	0	0	0	30	0
2	48	53	31	70	9	0	0	49	52
3	54	68	11	92	19	0	0	40	82
4	18	77	2	85	6	2	0	64	31
5	8	46	3	3	1	10	37	5	49
6	31	105	24	9	36	32	35	28	108

B. — Le vaccin T.A.B. utilisé pour l'immunisation des lots mentionnés a été préparé d'après la méthode KOLLE-PFEIFFER, ayant une densité microbienne de 1,5 milliards germes/ml (1 milliard *S. typhi*, 250 millions *S. paratyphi A* et 250 millions *S. paratyphi B)*.

Les souches utilisées, en forme « S », avec formule antigénique stable, étaient sélectionnées par rapport aux lysotypes prédominants en Roumanie et étaient de type fermentatif classique. Les caractères de virulence, toxicité et immunogenèse ont été déterminés au préalable sur souris de 14—18 g, selon les techniques courantes. L'immunogénéité des souches introduites dans le vaccin, appréciée par la survie des souris infectées expérimentalement, a varié entre 60—80%.

C. Les méthodes appliquées pour l'appréciation du degré et de la durée de la résistance spécifique conférée par la vaccination T.A.B. ont été les suivantes:

1. Les anticorps agglutinants « O » et « H » ont été déterminés par analyse qualitative sérique -méthode Oxford- utilisant comme antigènes des suspensions « O » et « H » de *S. typhi*. Pour la recherche des agglutinines « Vi » on a utilisé des germes vivants de *S. typhi Vi I Bathnagar*. La lecture des résultats a été faite après incubation de deux heures à 52° et 15 minutes à la température de la chambre pour les agglutinines « H »; 20 heures à 52° et 10—15 minutes à la température de la chambre pour les agglutinines « O »; 2 heures à 37° et pendant la nuit à la température de la chambre pour les agglutinines « Vi ».

2. Le pouvoir fixateur de complément des sérums a été déterminé par la méthode IDA BENGSTON. L'antigène utilisé dans la réaction a été préparé avec la souche *S. typhi Vi I Bathnagar*, en culture de 16—18 heures sur gélose, suspension en sérum physiologique (5 ml pour un tube de culture) réchauffée 1 heure à 60°. Le surnageant obtenu par centrifugation a été formolé 2%.

3. L'activité protectrice des sérums était appréciée selon le pourcentage de survie dans l'intervalle de 72 heures, des souris inoculées avec les dilutions progressives du sérum à examiner (1/1, 1/5, 1/10) et une dose certe léthale « DCL » de *S. typhi* Ty_2 (dose établie au préalable). Pour chaque dilution, on a utilisé 5 animaux. Chaque lot et chaque expérience étaient accompagnées de témoins pour vérifier l'efficience de la DCL (1/2 DCL, 1 DCL, 2 DCL, ainsi que des témoins inoculés avec du sérum normal de cheval et 1 DCL).

RÉSULTATS

Lot No. 1 — Les données obtenues par la recherche des anticorps agglutinants anti-typhiques « O », « H », et « Vi », le pouvoir fixateur de complément et le pouvoir protecteur, avant la vaccination et 6 mois après, sont consignées dans les tableaux III et IV.

Il ressort du tableau III que les anticorps agglutinants « H » et « O », ainsi que les anticorps fixateurs de complément, ont été présents seulement en titre bas et dans un pourcentage réduit, les anticorps « Vi » étant absents. Le pouvoir protecteur, testé sur 41 des 60 sérums de ce lot, a été mis en évidence chez 26 (63,4%). La plupart des sérums n'ont accordé qu'une protection de 10—20%, le pouvoir protecteur de 60, 70 ou 80% ne se rencontrant que dans quelques cas.

A remarquer qu'on n'a pas observé un parallélisme entre le titre agglutinant et celui fixateur du complément, d'une part, et le pouvoir protecteur des sérums, d'autre part. Ainsi, parmi les sérums à pouvoir protecteur, chez 29,75% d'entre eux, on a constaté l'absence des agglutinines et du pouvoir fixateur du complément.

L'analyse des données du tableau IV montre qu'à part les agglutinines « H » et « O » qui atteignent fréquemment de stitres élevés (86,7%—96,7%), les agglutinines « Vi » n'apparaissent que dans un seul cas sur les 30 sérums examinés et seulement en titre de 1/10, tandis que les anticorps fixateurs du complément, bien qu'en pourcentage double, ont présenté un titre stationnaire. Le pouvoir protecteur a été présent chez tous les sérums examinés, en proportion variant entre 15—70%.

Lot No. 2. Les résultats des examens sérologiques effectués sur 101 personnes sont consignés dans le tableau V.

Il ressort du tableau V, que les agglutinines « H » et « O » ont persisté une année après la vaccination, mais seulement en proportion de 38,7%, respectivement 67%, les agglutinines « Vi » étant absentes. Les anticorps fixateurs du complément ont été présents en pourcentage assez proche (14,9%) de celui obtenu 6 mois après la vaccination (16,7%), mais avec des titres plus réduits. Le pouvoir protecteur, étudié sur 41 sérums, a été mis en évidence dans 70,7% des cas, variant comme intensité entre 5—60%.

Lot No. 3. Les résultats des recherches entreprises sur des sérums provenant de 122 personnes complètement vaccinées deux années auparavant et qui avaient reçu, une année après, une injection de rappel, sont présentés dans le tableau VI.

Il ressort du tableau VI que, contrairement aux agglutinines anti- « H », qui n'ont été mises en évidence que dans 28,6% des sérums examinés, les agglutinines « O » ont été présentes en proportion de 80,3%. Les agglutinines « Vi » n'ont été observées que dans un seul cas; les anticorps fixateurs du complément ont été mis en évidence seulement dans 11,5% des sérums, tandis que le pouvoir protecteur s'est maintenu procentuellement au même niveau que le pouvoir protecteur des sérums des personnes complètement vaccinées une année auparavant et qui n'avaient pas reçu l'injection de rappel.

Lot No. 4. Les résultats des examens effectués sur 95 sérums provenant de personnes complètement vaccinées trois années auparavant et qui avaient reçu deux injections de rappel à une année d'intervalle, sont consignés dans le tableau VII.

Tableau III

Anticorps	Lot	Nombre sérums	Titre des sérums																			
			Négatifs		Positifs		1/25		1/50		1/100		1/250		1/500		1/1000					
			Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%				
« H »	1	60	52	86,6	8	13,4	6	10,0	—	—	2	3,4	—	—	—	—	—	—				
« O »	1	60	42	70,0	18	30,0	2	3,3	10	16,6	6	10,0	—	—	—	—	—	—				
« Vi »	1	60	60	100,0	—	—	1/10		1/20		1/40		1/80		1/160		1/320					
							—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
Fixateurs	1	60	55	91,7	5	8,3	1/2		1/4		1/8		1/16		1/32		1/64					
							3	5	1	1,6	1	1,6	—	—	—	—	—	—				
							%															
Séro-protection des souris	1	41					0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
							15	3	3	—	11	—	1	1	4	—	—	—	1	—	1	—	1	—	1/2	—	—

Tableau IV

Anticorps	Lot	Nombre sérums	Titre des sérums																			
			Négatifs		Positifs		1/25		1/50		1/100		1/250		1/500		1/1000					
			Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%				
« H »	1a	30	4	13,3	26	86,7	1	3,3	9	30	11	36,6	4	13,3	1	3,3	—	—				
« O »	1a	30	1	3,3	29	97,7	6	19,8	9	30	13	42,9	1	3,3	—	—	—	—				
« Vi »	1a	30	29	96,7	1	3,3	1/10		1/20		1/40		1/80		1/60		1/320					
							1	3,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
Fixateurs	1a'	30	25	83,3	5	16,7	1/2		1/4		1/8		1/16		1/32		1/64					
							1	3,3	3	9,9	1	3,3	—	—	—	—	—	—				
							%															
Séro-protection des souris	1a	15					0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
							—	—	—	2	1	1	2	4	2	—	1	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—

Tableau V

Anticorps	Lot	Nb. sérums	Titre des sérums																			
			Négatifs		Positifs		1/25		1/50		1/100		1/250		1/500		1/1000					
			Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%				
« H »	2	101	62	61,3	39	38,7	16	15,7	10	9,9	9	8,9	3	2,9	1	1	—	—				
« O »	2	101	34	34	67	67	16	23,8	17	25,3	24	35,8	9	13,4	1	1,5	—	—				
							1/10		1/20		1/40		1/80		1/160		1/320					
« Vi »	2	101	101	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
							1/2		1/4		1/8		1/16		1/32		1/64					
Fixateurs	2	101	86	85,1	15	14,9	10	9,9	5	4,9	—	—	—	—	—	—	—	—				

Séro-protection des souris			%																						
			0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	2	41	12	3	5	1	6	—	1	6	3	—	3	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—

Tableau VI

Anticorps	Lot	Nb. sérums	Titre des sérums																			
			Négatifs		Positifs		1/25		1/50		1/100		1/250		1/500		1/1000					
			Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%				
« H »	3	122	87	71,3	35	28,7	17	13,9	8	6,5	9	7,4	1	0,9	—	—	—	—				
« O »	3	122	24	19,7	98	80,3	16	13,1	26	21,3	47	38,5	8	6,5	—	—	1	0,8				
							1/10		1/20		1/40		1/80		1/160		1/320					
« Vi »	3	122	121	99,2	1	0,8	—	—	1	0,8	—	—	—	—	—	—	—	—				
							1/2		1/4		1/8		1/16		1/32		1/64					
Fixateurs	3	122	108	88,5	14	11,5	8	6,5	6	5	—	—	—	—	—	—	—	—				

Séro-protection des souris			%																						
			0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	3	45	15	4	4	—	3	1	2	3	2	—	1	2	3	1	1	1	2	—	—	—	—

Tableau VII

Anticorps	Lot	Nb. sérums	Titre des sérums																			
			Négatifs		Positifs		1/25		1/50		1/100		1/250		1/500		1/1000					
			Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%				
« H »	4	95	55	57,8	40	42,2	13	13,6	15	15,6	10	11	1	1,1	1	1,1	—	—				
« O »	4	95	29	30,5	66	69,5	17	18	21	22,1	24	25,2	3	3,1	1	1,1	—	—				
							1/10		1/20		1/40		1/80		1/160		1/320					
« Vi »	4	95	93	97,9	2	2,1	1	1,05	—	—	1	1,05	—	—	—	—	—	—				
							1/2		1/4		1/8		1/16		1/32		1/64					
Fixateurs	4	95	84	88,4	11	11,6	11	11,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
							%															
							0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Séro-protection des souris	4	41					4	1	—	1	4	7	5	4	6	1	2	—	3	1	1	—	1	—	—	—	—

Tableau VIII

Anticorps	Lot	Nb. sérums	Titre des sérums																			
			Négatifs		Positifs		1/25		1/50		1/100		1/250		1/500		1/1000					
			Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%				
« H »	5	54	20	37,1	34	62,9	8	15	16	30	8	15	1	1,8	1	1,8	—	—				
« O »	5	54	19	35,2	35	64,8	4	7,4	13	24,1	11	20,4	3	5,5	4	7,4	—	—				
							1/10		1/20		1/40		1/80		1/160		1/320					
« Vi »	5	54	45	83,1	9	16,9	5	9,2	3	5,5	—	—	1	1,9	—	—	—	—				
							1/2		1/4		1/8		1/16		1/32		1/64					
Fixateurs	5	54	28	52	26	48	13	24	2	4,0	3	5,5	7	12,9	1	1,9	—	—				
							%															
							0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
Séro-protection des souris	5	26					4	—	2	1	3	—	4	4	—	1	2	2	—	—	—	1	1	—	—	1	—

Il résulte du tableau VII que les agglutinines « H » ont été plus fréquemment décelées dans les sérums de ce lot que dans les sérums du lot précédent (42,2%), tandis que les agglutinines « O » sont apparues en taux plus réduit (69,5%). Les agglutinines « Vi » ont été présentes seulement chez 2,1% des sérums.

Les anticorps fixateurs ont été signalés avec une fréquence similaire à celle du lot antérieur (11,6%), avec des titres très bas (1/2). Par contre, on a observé une augmentation significative de la proportion des sérums dotés d'un pouvoir protecteur (90,2%) variant comme intensité de 5 à 80%.

Lot No. 5. Les résultats des examens sérologiques effectués sur 54 anciens malades de fièvre typhoïde, excréteurs par les fèces de *S. typhi* et confirmés bactériologiquement, sont consignés dans le tableau VIII.

On observe des données du tableau VIII que les agglutinines « H » ont été présentes dans 62,96% des sérums, et les anticorps « O » en proportion de 64,8%, incidence proche de celle constatée dans les sérums des sujets complètement vaccinés trois années auparavant, ayant reçu deux inoculations de rappel. Par contre, on a mis en évidence les agglutinines « Vi » en titre de 1/10—1/80 dans 16,9% des sérums, leur présence coïncidant avec l'état de porteur, confirmé bactériologiquement. Les anticorps fixateurs de complément ont été également présents en proportion élevée (48% des sérums) en titres variant de 1/2 à 1/32.

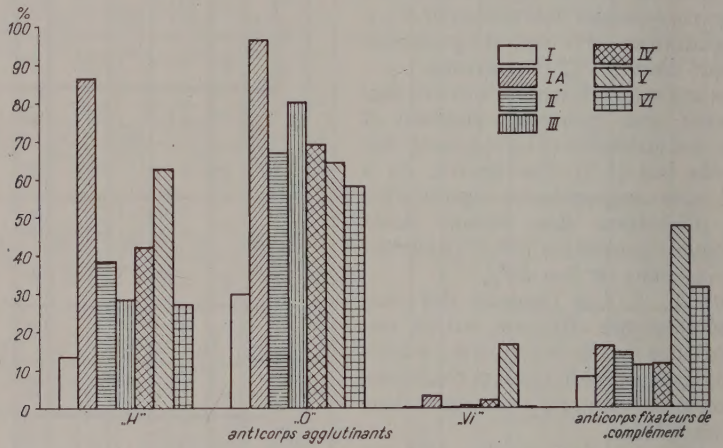
Le pouvoir protecteur a été constaté chez 84,6% des sérums, dans des limites d'intensité variant entre 10% et 95%.

Lot No. 6. Les résultats des analyses effectuées sur les sérums provenant de 136 anciens malades de fièvre typhoïde, non-porteurs (examens bactériologiques répétés négatifs), sont présentés dans le tableau IX.

Tableau IX

Anticorps	Lot	Nb. sérums	Titre des sérums																			
			Négatifs		Positifs		1/25		1/50		1/100		1/250		1/500		1/1000					
			Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%	Nb.	%				
« H »	6	136	99	72,7	37	27,2	12	8,8	7	5,1	11	8	6	4,4	1	0,7	—	—				
« O »	6	136	57	41,9	79	58,1	14	10,3	21	15,4	38	27,9	5	3,6	1	0,7	—	—				
							1/10		1/20		1/40		1/80		1/160		1/320					
« Vi »	6	136	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—				
							1/2		1/4		1/8		1/16		1/32		1/64					
Fixateurs	6	136	93	68	43	31,9	19	13,9	12	9	8	5,9	3	2,3	1	0,8	—	—				
			%																			
Séro-protection des souris	6	50	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
			1	2	1	2	3	1	5	9	3	2	3	3	1	1	3	1	6	—	1	1	1

Il ressort du tableau IX que les anticorps agglutinants « H » et « O » sont en proportion plus réduite que dans le lot précédent (27,2% respectivement 58,1%) les agglutinines « Vi » étant totalement absentes. De même, on constate un pour-



Graphique 1 — Image comparative de la présence des anticorps agglutinants « O », « H », « Vi » et fixateurs du complément des lots étudiés.

centage plus réduit des sérums contenant des anticorps fixateurs de complément (31,9%). Une caractéristique significative des sérums de ce lot est représentée par le pouvoir protecteur marqué (98% des sérums), d'une intensité allant de 5 à 100%.

Tableau X

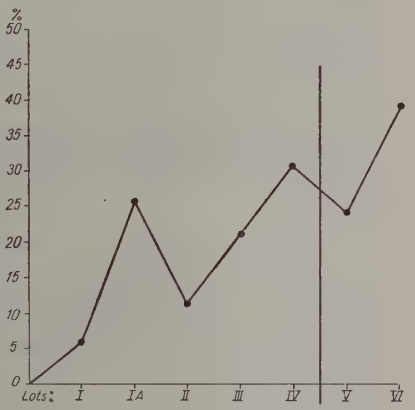
Groupe	Sérums testés		Sérums protecteurs		Pouvoir protecteur chez les animaux			
					inoculés		survivants	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
1	41	100	26	63,4	630	100	81	5,3
1a	15	100	15	100,0	300	100	106	25,3
2	41	100	29	70,7	780	100	152	11,4
3	45	100	30	66,6	835	100	199	21,8
4	41	100	37	90,2	725	100	228	31,4
5	26	100	37	90,2	725	100	228	31,4
6	50	100	49	98,0	990	100	462	38,3

L'image comparative de la présence des anticorps agglutinants « O », « H », « Vi » et fixateurs de complément des lots étudiés est reproduite dans le graphique 1.

Analysant le degré de protection conféré par les sérums des différents lots, par rapport aux témoins, en fonction des animaux survivants, on observe (ainsi qu'il ressort du tableau X) que parmi les sérums des groupes vaccinés, les sérums provenant des personnes vaccinées complètement, trois années auparavant et ayant reçu deux inoculations de rappel pendant deux années consécutives, présentent le pouvoir protecteur le plus élevé (lot no. 4).

Dans les lots témoins (5 et 6) le degré de protection le plus élevé est constaté chez les anciens malades non-porteurs (lot 6).

La représentation graphique du degré de protection consigné dans le tableau X, est illustrée dans le graphique 2.



Graphique 2 — Degré de protection conférée aux lots étudiés.

DISCUSSION

Les recherches effectuées sur le profil immunologique des divers groupes examinés, existant parmi une population avec un potentiel épidémiologique relativement connu, ont permis une série d'observations qui méritent d'être discutées.

En premier lieu, il faut remarquer que le sérum des anciens malades de fièvre typhoïde, excréteurs ou non-excréteurs de germes, bien que présentant (fait connu) du point de vue pratique une immunité durable, n'offrent pas un degré de protection très élevé pour la souris.

Cependant, si on considère comme critérium de l'état d'immunité le degré de protection constaté dans les sérums des anciens malades de fièvre typhoïde non-excréteurs (lot 6), le pouvoir protecteur des sérums provenant de non-vaccinés et vaccinés dans diverses conditions, prouve que la résistance spécifique augmente lentement et proportionnellement aux inoculations de rappel, la hausse du pouvoir protecteur constatée après la première vaccination n'étant que transitoire et de courte durée.

Toutefois, dans les conditions de vaccination de la population étudiée, aucun groupe n'a atteint le pouvoir protecteur manifesté par les sérums des anciens malades non-excréteurs.

Nous nous posons le problème — le fait mérite d'être étudié à l'avenir — si une troisième inoculation de rappel faite 3 ans après la primo-vaccination, ne contribuerait à l'augmentation du pouvoir protecteur des sérums des vaccinés, jusqu'au niveau atteint par les anciens malades non-excréteurs.

Partant de ces considérations, nous nous demandons de nouveau si en dehors du test épidémiologique qui est coûteux et difficile à réaliser, on ne pourrait employer le pouvoir protecteur des sérums des anciens malades non-excréteurs

comme critérium d'étalon de l'efficience des vaccins T.A.B., dont la méthode de préparation et d'administration est si différente actuellement.

Etant donné que l'homme représente la seule espèce qui fasse spontanément la fièvre typhoïde, il va de soi que le pouvoir protecteur des sérums des anciens malades de fièvre typhoïde, probablement en relation aussi avec l'absence d'autres facteurs des sérums des lapins immunisés en conditions de laboratoire, pourrait constituer un critérium plus approprié pour l'estimation de l'efficience d'un vaccin T.A.B.

Un autre fait, observé également par de nombreux auteurs (7, 8, 9, 11) et qui ressort clairement de nos recherches, est représenté par la discordance entre les différents tests utilisés pour apprécier l'efficience des vaccins T.A.B.

CONCLUSIONS

1. L'étude du profil immunologique d'un groupe d'individus, existant dans une population avec un potentiel épidémiologique de fièvre typhoïde relativement connu, peut refléter l'état de résistance spécifique et contribuer à l'établissement des conditions optimes d'administration d'un vaccin T.A.B., dans le but d'obtenir une réponse immunologique maximum.

2. Si on considère le titre moyen du pouvoir protecteur des sérums des anciens malades de fièvre typhoïde non-excréteurs, comme test de comparaison avec le titre des sérums récoltés des non-vaccinés ou vaccinés dans de conditions différentes, on constate que le groupe de sujets vaccinés complètement, ayant reçu ultérieurement deux inoculations de rappel, a présenté des sérums avec le pouvoir protecteur le plus proche de celui des sérums des anciens malades de fièvre typhoïde non-excréteurs.

3. Dans la dynamique de la vaccination et revaccination par le vaccin T.A.B. le pouvoir protecteur des sérums s'installe et se consolide lentement, paraissant être proportionnel au nombre des inoculations de rappel. Après la première-vaccination on ne constate qu'une augmentation transitoire et de courte durée du pouvoir protecteur.

4. Parmi les méthodes de laboratoire utilisées pour l'appréciation de l'efficience du vaccin T.A.B., la détermination du pouvoir protecteur semble être une méthode d'élection, si l'on tient compte qu'elle est plus constante et de plus longue durée, par rapport aux observations faites sur les sérums des anciens malades de fièvre typhoïde.

La présence des agglutinines et le pouvoir fixateur des sérums sont des données qui ne peuvent être prises en considération pour l'appréciation de l'efficience d'un vaccin T.A.B.

On ne constate aucun parallélisme entre la présence des agglutinines « H », « O » et « Vi » et le pouvoir fixateur du complément des sérums des vaccinés ou des anciens malades de fièvre typhoïde d'une part, et le pouvoir protecteur des sérums, d'autre part.

BIBLIOGRAPHIE

1. Andreesco Gh. et Combiesco D. — Rev. Ştiinţelor Medicale, 1916, **1**, 13.
2. Ciuca M. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1931, **4**, 217.
3. Ciuca M., Nestoresco N., Popovici M. et coll. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 321.

4. Combiescu C. — Rev. Igienă Socială, 1940, Nr. 1—6, 559.
5. Cvetanovic B. B. — Am J. Publ. Health, 1957, **47,** 778.
6. Doerr R. — Klin. Wschrft., 1932, **11,** 1409.
7. Edsall G. — Atti del Sec. Congr. Intern. di stand. immunomicrobiologica, 1956, Roma, 10—14 sept., p. 327.
8. Gören S. et Akyay N. — Türk. Jj. Tecr. Byol. Derg., 1956, **16,** 164.
9. Grasset E. — Atti del Sec. Congr. Intern. di stand. immunomicrobiologica, 1956 Roma, 10—14, sept. p. 281.
10. Ikic D. et Benkovic I. — Higijena, 1955, **7,** 258.
11. Mason J. H. et Robinson M. — S. Afr. Med. J., 1950, **24,** 1096.
12. Bull. Org. Mond. Santé, 1957, **16,** 897.
13. Bull. Org. Mond. Santé, 1959, **20,** 1017.
14. Raettig H. — Typhusimmunität und Schutzimpfung — Ed. Gustav Fischer, Jena, 1952.

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ СОЗДАВАЕМАЯ АНТИТИФОПАРАТИФОЗНЫМИ ПРИВИВКАМИ ПО СРАВНЕНИЮ С СОСТОЯНИЕМ ИММУНИТЕТА БЫВШИХ БОЛЬНЫХ БРЮШНЫМ ТИФОМ — КРИТЕРИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ДЕЙСТВЕННОСТИ Т.А.В. ВАКЦИНЫ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Критерии для оценки действенности прививок Т.А.В. в целях предупреждения брюшно-тифозных-паратифозных инфекций являются весьма разнообразными и зачастую дают указания, далекие от действительности. Для наиболее точного определения специфической защиты создаваемой Т.А.В. вакциной, были подвергнуты сравнительному исследованию особы группы лиц вакцинированных в различных условиях — по сравнению с группами, иммунизированными в результате заболевания (бывшие больные брюшным тифом — носители и непосители возбудителей).

Исследования охватили 568 лиц, распределенных на 6 различных групп.

Оценка степени и продолжительности создаваемой прививками специфической резистентности производилась путем исследования агглютинирующих антител, связывающих комплемент антител, а также путем исследования защитных свойств сывороток.

Если в качестве теста принимать во внимание средний титр защитных свойств сыворотки бывших больных брюшным тифом, не выделяющих возбудителей, для его сравнения с титром сывороток, полученных у лиц ,привитых или непривитых в различных условиях, оказывается, что у полностью привитых лиц, подвергшихся затем двум повторным прививкам, получаются сыворотки, обладающие защитными свойствами, наиболее приближающимися к среднему титру.

При вакцинациях и ревакцинациях с использованием Т.А.В. вакцины, защитная сила сывороток появляется и медленно закрепляется и она, повидимому, пропорциональна числу повторных прививок. После первой вакцинации отмечается лишь кратковременное, транзиторное повышение защитной силы вакцины.

Среди лабораторных методов, использованных для оценки действенности Т.А.В. вакцины, определение ее защитной силы является, повидимому, преимущественным методом, если принять во внимание, что это ее свойство наблюдается наиболее постоянно и оно наиболее продолжительно по сравнению с свойствами сывороток бывших больных брюшным тифом.

Наличие агглютининов и связывающей комплемент способности сывороток не может приниматься во внимание при оценке действенности Т.А.В. вакцин.

Не было отмечено какого-либо параллелизма между наличием агглютининов Т.Н., Т.О. и Vi, связывающими комплемент свойствами сывороток, вакцинированных или бывших больных брюшным тифом — с одной стороны и между защитными свойствами сывороток — с другой стороны.

DIE DURCH TYPHUS-PARATYPHUSSCHUTZIMPFUNG VERLIEHENE SPEZIFISCHE WIDERSTANDSFÄHIGKEIT IM VERGLEICH MIT DEM IMMUNITÄTSZUSTAND NACH ÜBERSTEHEN DER KRANKHEIT ALS KRITERIUM BEI DER BEURTEILUNG DER WIRKSAMKEIT DER T.A.B.-SCHUTZIMPFUNG

ZUSAMMENFASSUNG

Die Kriterien, auf deren Grundlage die Wirksamkeit der T.A.B. — Schutzimpfung bei der Verhütung der Typhus-Paratyphusinfektionen beurteilt wird, sind sehr verschieden und liefern oft Angaben, die von der Wirklichkeit weit enfernt sind. Um die spezifische Schutzwirkung des T.A.B. Impfstoffes möglichst genau zu erfassen, wurden ausgewählte Gruppen von unter verschiedenen Bedingungen geimpften und solche von durch Überstehen der Krankheit immunisierten Personen (gewesene Patienten, ob Bazillenträger oder nicht) vergleichend untersucht.

Die Untersuchung umfasste eine Anzahl von 568 in 6 verschiedene Gruppen eingeteilte Personen.

Das Ausmass und die Dauer der durch Schutzimpfung hervorgerufenen spezifischen Widerstandsfähigkeit wurden auf Grund von Bestimmungen der agglutinierenden Antikörper, der komplementbindenden Antikörper und der Schutzwirkung der Sera beurteilt.

Nimmt man den mittleren Titer der Schutzwirkung der Sera von gewesenen Typhuskranken (Nichtausscheider) als Grundlage des Vergleichs mit den Titern der Sera von ungeimpften oder unter verschiedenen Bedingungen geimpften Personen so ergibt sich, dass vollständig geimpfte Personen, die später zwei mal durch je eine Einspritzung wiedergeimpft wurden, Sera mit einer Schutzwirkung, die dieser Grundzahl am nächsten kommt aufweisen.

In der Dynamik der Impfung und Wiederimpfung mit T.A.B. — Impfstoff stellt sich die Schutzwirkung der Sera langsam ein und verfestigt sich allmählich. Sie scheint der Anzahl der Wiederimpfungen proportional zu sein. Nach der ersten Schutzimpfung beobachtet man bloss einen vorübergehenden und kurz dauernden Anstieg der Schutzwirkung.

Unter den zur Abschätzung der Wirksamkeit des T.A.B. — Impfstoffes verwendeten Laboratoriumsmethoden, scheint die Bestimmung der Schutzwirkung das Verfahren der Wahl zu sein, wenn man in Betracht zieht, dass diese Wirkungsqualität, im Vergleich mit dem, was sich in den Sera gewesener Typhuskranken feststellen lässt, am konstantesten und beständigsten ist.

Die Anwesenheit von Agglutininen und von komplementbindenden Antikörpern kann zur Beurteilung der Wirksamkeit eines T.A.B. — Impfstoffes nicht herangezogen werden.

Zwischen der Anwesenheit von „H"; „O" — und „Vi"-Agglutininen und komplementbindenden Antikörpern in den Sera geimpfter Personen oder gewesener Typhuspatienten einerseits und der Schutzwirkung dieser Sera andererseits, lässt sich kein Parallelismus feststellen.

A CRITERION FOR ESTIMATING THE EFFICIENCY OF T.A.B.-VACCINE: THE SPECIFIC RESISTANCE CONFERRED BY TYPHOID-PARATYPHOID VACCINATION AS COMPARED WITH THE IMMUNITY ACQUIRED BY FORMER TYPHOID FEVER PATIENTS

SUMMARY

The criteria applied in estimating the efficiency of T.A.B. vaccination as regards the prevention of typhoid-paratyphoid infections are highly varied and often yield indications which are rather far from reality. In order to investigate as exactly as possible the specific protection conferred by T.A.B. vaccine, selected groups of subjects vaccinated under various circumstances were studied in comparison with persons who had acquired immunity as a consequence of undergoing the disease (former patients, either carriers or not).

The study comprised a number of 568 subjects divided into 6 different groups.

The degree and duration of specific resistance conferred by vaccination were estimated by determining agglutinating and complement-fixing antibodies, and the protective power of the sera.

If the mean protective potency titre of the sera from former typhoid fever patients (non-carriers) is taken as a basis of comparison with the titres of sera collected from subjects vaccinated under various circumstances or not at all, the sera of subjects who had received a complete course of immunization followed later on by 3 booster inoculations displayed protective potencies which came closest to this level of reference.

In the dynamics of vaccination and revaccination with T.A.B. vaccine, the protective potency of the sera is slow to set in and to become established and appears to be directly related to the number of booster inoculations. The first vaccination is found to be followed but by a transitory and short increase of protective potency.

Among the laboratory methods used in estimating the efficiency of T.A.B. vaccination, determination of the protective potency appears to be the method of choice, since this is the most constant and persistent manifestation as related to the findings made in the sera of former typhoid fever patients.

The presence of agglutinins and of complement-fixing antibodies in the sera cannot be used for the estimation of the efficiency of T.A.B. vaccine.

No parallelism was found to exist between the presence of "H", "O" and "Vi" agglutinins, and complement-fixing antibodies in the sera of vaccinated subjects or of former typhoid fever patients on the one hand, and the protective potency of the sera on the other.

RECHERCHES SUR LE RÔLE DU SYSTÈME RÉTICULO-ENDOTHÉLIAL DANS L'IMMUNITÉ DE LA TRICHINELLOSE EXPÉRIMENTALE

par

Gh. Lupaşco, Paula Solomon, Alice Hacig, Al. Gh. Ciplea, C. Ciurea et Larissa Ianco

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Laboratoires d'Helminthologie, Histopathologie et Chimie parasitaire)

— Manuscrit reçu le 13 février 1961 —

L'immunologie des parasitoses constitue un vaste problème, dû en grande partie au fait que la structure des parasites pluricellulaires étant complexe, leurs antigènes sont moins bien connus que ceux des organismes unicellulaires, la réactivité de l'organisme présentant un polymorphisme accentué. La localisation du parasite dans l'organisme-hôte dirige également son antigénicité de différentes manières. Ainsi, le ténia, le bothriocéphale, l'ascaride, l'oxyure, l'ankylostome, ayant habitat dans l'intestin, donnent lieu à de faibles réactions sérologiques; les filaires, la trichinella, les leishmania, les tripanosomes, les hématozoaires et les toxoplasmes, qui infestent l'organisme dans son intimité, provoquent la formation de nombreux anticorps.

Ducas (1921) a montré que chez les rats infestés avec la *Trichinella spiralis* se développe une immunité appréciable envers les infections survenues ultérieurement, théorie non-acceptée à la date de sa publication mais confirmée par la suite par Mc Coy (1931), Bachmann et Gonzales (1936). Mc Coy approfondit les observations de Ducas montrant que les rats qui ont subi une infection sont capables de résister à une nouvelle infection avec des doses doubles par rapport à la dose considérée léthale pour les animaux témoins non-infestés au préalable. Il n'y a qu'un dixième des larves ayant servi à l'infestation des animaux immuns qui arrive à la maturité sexuelle, étant toutefois éliminées avant la déposition des embryons. Le développement de l'immunité à caractère général a été discuté déjà en 1916 par Salzer. Ces faits prouvent que chez l'animal-hôte se développe non seulement une résistance intestinale locale, mais aussi une immunité générale envers le parasite. Des recherches ultérieures ont combattu en partie ou en totalité les opinions de Salzer. L'idée sur l'immunité générale a été remise en discussion lorsque Geller (1933) et Taliaferro (1940) ont prouvé que les adultes de *Trichinella spiralis* viennent en contact avec les humeurs tissulaires et le sérum sanguin de l'hôte. Les recherches entreprises entre 1924—1927 par Benassi, Collon, Dustin et plus récemment en 1951 par Mosighina montrent que la réponse immunobiologique de l'organisme est en étroite liaison avec l'état fonctionnel, le système réticulo-endothélio-histiocytaire, son blocage pouvant modifier les réactions immunobiologiques de l'organisme. Aschoff (1913) réunit sous le nom

de système réticulo-endothélial, toutes les cellules disséminées dans les différents tissus capables d'accumuler dans leur cytoplasme des colorants spéciaux (vitaux). Le blocage du système réticulo-endothélial — méthode qui consiste dans la saturation à la limite du possible de toutes les cellules du système réticulo-endothélial par l'inoculation plus ou moins massive de différentes substances colloïdes électro-négatives — ne peut être que relativement réalisé; en effet, le blocage n'est pas constant mais toujours momentané, le système réticulo-endothélial ayant la propriété de renouveler ses cellules par une superactivité compensatrice du blocage.

Les dernières recherches ont attribué l'élaboration des anticorps au système réticulo-endothélial et en particulier au plasmocyte et aux éléments de la série lymphoïde — spécialement aux formations jeunes de cette série —(Taliaferro, Cushing, Fagraeus); étant donné que la fraction globulinique des protéines sériques a un rôle dans l'immunité, on attribue au système réticulo-endothélial — à part ses autres fonctions (fagocytaires, métaboliques, fermentatives) — un rôle important dans l'immunité, par le processus de la globulinogenèse.

Nous basant sur ces données, nous nous sommes proposé d'étudier le rôle du système endothélial dans l'immunité de la trichinellose expérimentale en conditions de blocage à intervalles fixes: avant, au cours et après l'infestation des animaux avec la *Trichinella spiralis*.

Dans la présente étude on a poursuivi: la densité des parasites dans les trois phases évolutives simultanément avec les modifications de la formule leucocytaire, les fractions des protéines sériques par électrophorèse, la réponse de l'organisme par les méthodes immunobiologiques ainsi que les modifications histopathologiques qui accompagnent le processus d'infestation parasitaire à la suite de la modification fonctionnelle du système réticulo-endothélial, réalisée par blocage partiel.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nos expériences ont été effectuées sur des animaux du même âge et du même poids afin d'éviter les éventuelles variations dans l'évolution de la maladie, variations qui auraient pu dépendre de l'âge différent des animaux ou de leur état varié de nutrition. De même, le nombre et l'âge des larves administrées ont été constants. Comme animal d'expérience nous avons choisi le cobaye, vu sa susceptibilité naturelle élevée à l'infection avec la *Trichinella spiralis*. Les animaux ne présentaient aucune infection intestinale ou pulmonaire et ont été soumis à un même régime.

Les larves utilisées à l'infestation des animaux provenaient d'une souche conservée dans le laboratoire (sur cobayes et rats) et étaient récupérées par digestion peptique d'après la méthode de Mc Coy. Le nombre des larves a été calculé dans une suspension de 10 ml sérum physiologique, parfaitement homogénéisée, par prélèvement à l'aide d'une micro-pipette de 0,1 ml, étalée sur une lame sous forme de bande qui ne dépassait pas la largeur du champ microscopique. L'homogénéisation était considérée satisfaisante dans le cas où plusieurs dénombrements successifs dans la même suspension ne révélaient pas de différences plus grandes que $\pm$ 5%. Le nombre des larves d'une prise de 0,1 ml se multiplie par 100 (dilution) afin de déterminer la densité larvaire de la suspension de 10 ml. L'infes-

tation a été toujours effectuée avec une dose d'environ 1000 larves. Les animaux qui devaient être infestés ou sacrifiés étaient gardés à jeun pendant 12 heures.

Le dénombrement des adultes de l'intestin a été fait par prélèvement de la moitié postérieure de l'intestin grêle (jusqu'au caecum), sectionné en long et fragmenté transversalement, introduit dans des flacons avec du sérum physiologique; conservation à la température de la chambre; après 12 heures, centrifugation à 500 t/m, examen microscopique du sédiment et des fragments intestinaux et dénombrement des adultes, femelles et mâles. Pour le calcul des embryons dans la phase sanguine, on a utilisé la méthode classique de Stäubli; la densité larvaire dans la phase musculaire a été calculée en comptant les larves récupérées de toute la musculature de l'animal à l'aide de la méthode de la digestion peptique (Mc Coy).

Le blocage du système réticulo-endothélial a été réalisé par injection intrapéritonéale du colorant vital bleu de trypan 1% en quantité de 4 ml au cours de 8 jours (par 1 ml à intervalle d'un jour). Selon Jahontova la dose de 8 ml représenterait pour un cobaye de 300—350 g la dose maximum qui, administrée pendant une semaine, détermine des modifications toxiques graves, suivies par la mort de l'animal. Considérant ce fait, ainsi que la nécessité de maintenir en vie les animaux en expérience le plus longtemps possible, nous avons choisi, après tâtonnements répétés, la dose mentionnée qui assure en mesure suffisante le blocage du système réticulo-endothélial, sans déterminer des modifications toxiques irréversibles. En effet, l'administration de cette dose produit un blocage massif des éléments réticulo-endothéliaux du foie — cellules Kupffer — et de la rate, ainsi que des histiocytes du tissu conjonctif. On remarque aussi la présence des granules fins de trypan dans les cellules hépatiques cordonales, ce qui dénote que les doses de bleu de trypan administrées représentent un niveau élevé du blocage réticulo-endothélial de l'organisme.

Étant donné qu'en ce qui concerne le blocage, l'encre de Chine présente une plus grande électivité que le bleu de trypan, les expériences ont été reprises ultérieurement en conditions identiques avec de l'encre de Chine.

Les cobayes d'un poids d'environ 300—350 g ont été répartis en 4 lots, dont 3 de 30 animaux chacun et 1 lot témoin de 20 animaux. Le premier lot noté avec « A », a été injecté par voie intrapéritonéale avec 1 ml bleu de trypan 1%, totalisant 4 ml de colorant en 8 jours; après cette période les animaux ont été infectés « per os » avec environ 1000 larves de *Trichinella spiralis*, contrôlés du point de vue de leur viabilité. Le deuxième lot, noté avec « B » a été inoculé de même avec 4 ml bleu de trypan 1% par voie intrapéritonéale pendant 8 jours, recevant en même temps que la première inoculation de colloïde vital, la dose d'environ 1000 larves per os. Le troisième groupe, noté avec « C » a été d'abord infesté avec la dose de 1000 larves, le blocage par le bleu de trypan administré dans les mêmes doses et conditions que dans les lots précédents « A » et « B » étant effectué 8 jours après l'infestation (alors qu'on suppose que la phase intestinale est en grande partie réalisée). Le quatrième groupe de 20 cobayes, noté avec « D » a servi comme témoin sans être bloqué, mais seulement infesté avec environ 1000 larves.

Les expériences ont été organisées de telle manière que tous les lots d'animaux ont reçu la dose infectante de la même souche et le même jour dans l'intervalle d'une demi-heure, le lot « A » étant évidemment bloqué 8 jours auparavant.

L'évolution de l'infection, la réponse immunobiologique de l'organisme, ainsi que l'étude histologique dans les conditions de blocage et de non-blocage a été poursuivie périodiquement. Ainsi, pour la phase intestinale chez le cobaye nous la considérons en grande partie accomplie dans l'intervalle de 8 jours. Pour la phase sanguine, les animaux ont été saignés à blanc, du coeur, le 13—14 jour; pour la phase musculaire nous avons considéré suffisant le terme de 45 jours pour obtenir des larves déjà spiralées, capables de résister à la digestion peptique.

RÉSULTATS

Lot «A»

Chez le lot « A », infesté après 8 jours de blocage, nous avons constaté, chez 6 cobayes sacrifiés, les densités suivantes: dans la *phase intestinale*, la densité des adultes a été en moyenne de 34 femelles et 51 mâles; dans la *phase sanguine* la moyenne des embryons a été de 20; dans la *phase musculaire* la densité larvaire a été en moyenne de 120.000 larves.

Du point de vue clinique, les animaux ont présenté une diminution pondérale marquée, somnolence et hérissement des poils. Les animaux de ce lot ont présenté la mortalité la plus élevée, dans de nombreux cas par complications pulmonaires.

La *formule leucocytaire* a présenté, en général, pour toutes les trois phases, des variations assez marquées qui s'intègrent toutefois dans les limites larges constatées par KLIENEBERGER et DUMAS chez les cobayes normaux; à signaler que seules les polynucléaires basophiles dépassent de beaucoup la limite normale atteignant jusqu'à 13,5% (normal 1—6,5%).

La *réaction allergique cutanée* a été pratiquée avec un antigène total lyophilisé 1:10.000; l'absence de manifestations de la réactivité locale par l'apparition de vésicules ainsi que la pigmentation intense des téguments qui empêche de déceler d'éventuels érythèmes, nous ont mis dans l'impossibilité de tirer des conclusions.

Les *réactions de précipitation sur larves vivantes* ont été plus facilement poursuivies par transparence, l'appréciation de l'intensité des réactions s'effectuant en fonction de la quantité de précipité circumatrial et du nombre des larves qui permettent sa formation. La réaction a été positive dès la phase intestinale, appréciée comme sufisamment intense (pour la phase respective), son intensité augmentant dans les autres phases d'évolution de la *Trichinella spiralis*, respectivement dans les phases sanguine et musculaire lorsque le précipité formé est abondant.

Protéinémie: les fractions des protéines sériques ont été déterminées par la méthode classique de l'électrophorèse sur papier. Celle-ci a été effectuée chez tous les animaux avant l'infestation afin d'obtenir les valeurs initiales par rapport auxquelles on a estimé les variations ultérieures. Les animaux de ce lot ont présenté déjà dans la phase intestinale des modifications sensibles de la proportion des différentes fractions, par rapport aux valeurs moyennes normales. Ainsi, on constate une diminution importante des sérum-albumines (moyenne 34%) accompagnée d'une augmentation sensible des fractions α globuliniques (60%) et β globuliniques (moyenne 35%), ainsi que d'une augmentation modérée des γ globulines (12%). Ces modifications se maintiennent avec de légères oscillations, tant dans la phase sanguine que dans la phase musculaire. Les valeurs numériques sont consignées dans le Tableau I et II où les chiffres représentent les valeurs moyennes.

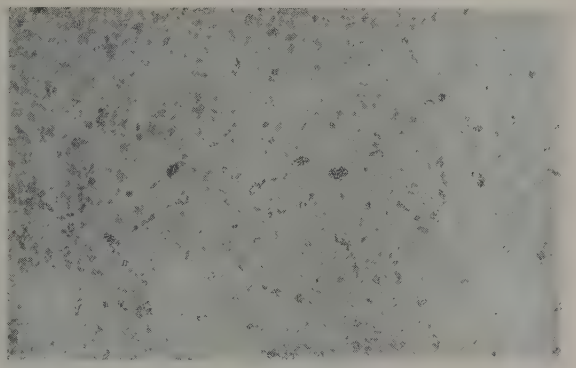


Photo 1. Foie de cobaye infesté avec des larves de *Trichinella spiralis*. Blocage à l'encre de Chine. Les cellules Kupffer, en grand nombre contiennent des particules d'encre de Chine. Hyperplasie accentuée réticulo-endothéliale.

Microphotographie Oc. 10 Ob. 10. Coloration avec du carmin.

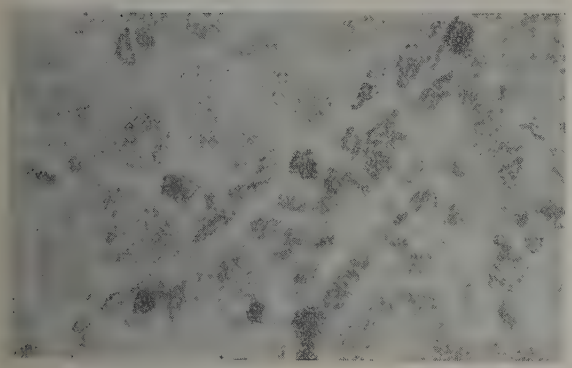


Photo 2. Foie de cobaye infesté avec des larves de *Trichinella spiralis*. Blocage à l'encre de Chine. On observe, dans l'espace Kiernan, des histiocytes qui ont englobé des particules d'encre de Chine

Microphotographie. Oc. 10 Ob. 40. Coloration avec du carmin.

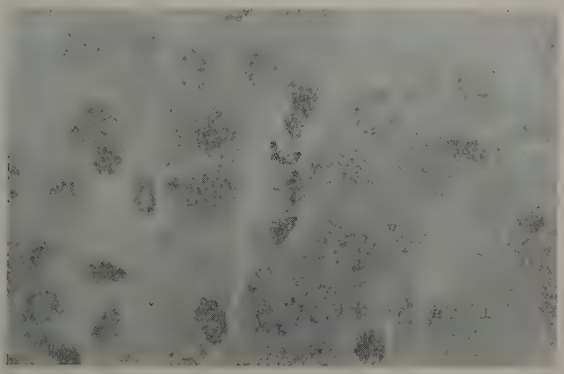


Photo 3. Foie de cobaye infesté avec des larves de *Trichinella spiralis*. Blocage à l'encre de Chine. On observe une cellule Kupffer qui a englobé des particules d'encre.

Microphotographie Oc. 10 Ob. 90 Coloration avec du carmin.

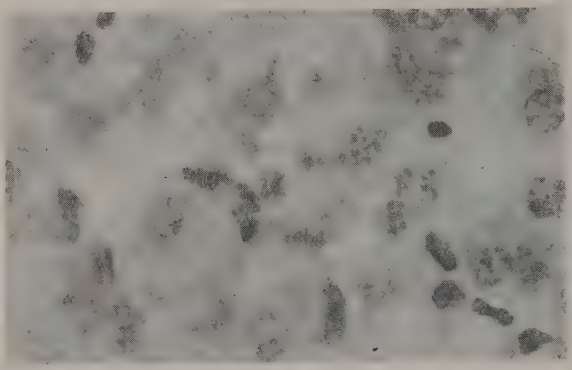


Photo 4. Foie de cobaye infesté avec des larves de *Trichinella spiralis*. Blocage à l'encre de Chine. Zone de nécrose des éléments cellulaires hépatiques.

Microphotographie Oc. 10 On. 90. Coloration avec de l'hématoxyline-éosine.

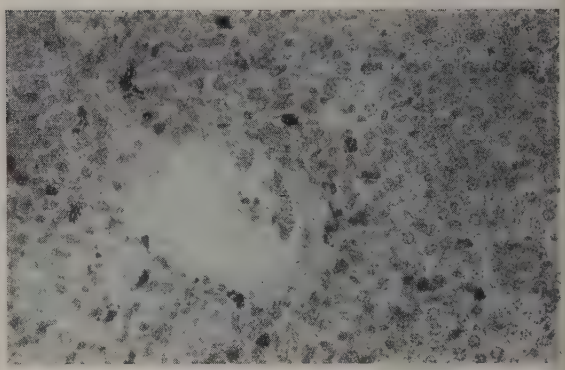


Photo 5. Foie de cobaye infesté avec *Trichinella spiralis*. Blocage à l'encre de Chine. Hyperplasie accentuée des éléments Kupffer, massive atrocytose des particules d'encre de Chine.

Microphotographie Oc. 10 Ob. 10 Coloration avec du carmin.

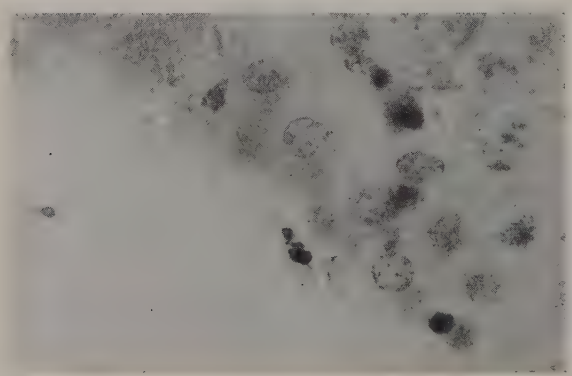


Photo 6. Foie de cobaye infesté avec des larves de *Trichinella spiralis*. Blocage à l'encre de Chine. Cellule endothéliale de la veine centro-lobulaire ayant englobé des particules d'encre de Chine. Microphotographie Oc. 10 Ob. 90. Coloration avec du carmin.

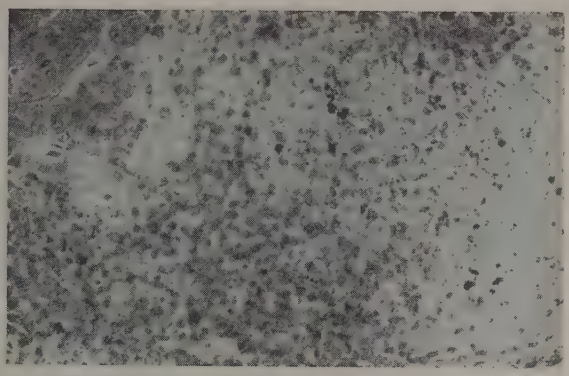


Photo 7. Foie de cobaye infesté avec des larves de *Trichinella spiralis*. Blocage à l'encre de Chine. Île de nécrose dans le foie. Nombreux éléments réticulo-endothéliaux ayant englobé des particules d'encre de Chine.
Microphotographie Oc. 10 Ob. 10 Coloration avec du carmin.

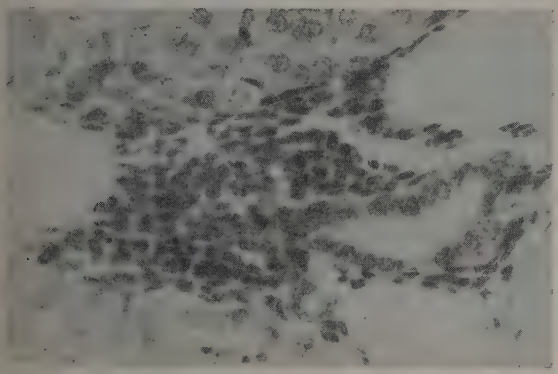


Photo 8. Foie de cobaye infesté avec des larves de *Trichinella spiralis*. Blocage à l'encre de Chine. Infiltration avec des éléments mononucléaires dans l'espace Kiernan.
Microphotographie O. 10 Ob. 40. Coloration avec de l'hématoxyline-éosine

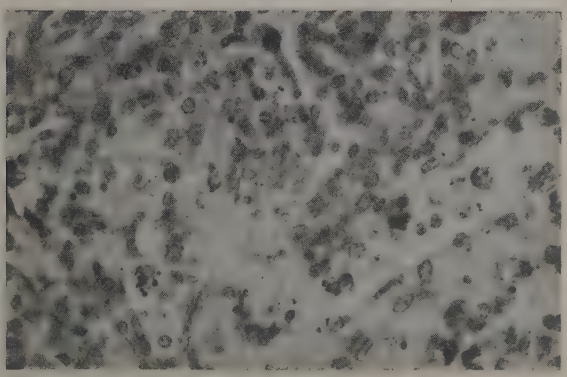


Photo 9. Rate de cobaye infesté avec des larves de *Trichinella spiralis*. Blocage à l'encre de Chine. Hyperplasie réticulo-endothéliale accentuée et nombreux éléments cellulaires ayant englobé des particules d'encre de Chine. Microphotographie Oc. 10 Ob. 40 Coloration avec du carmin.

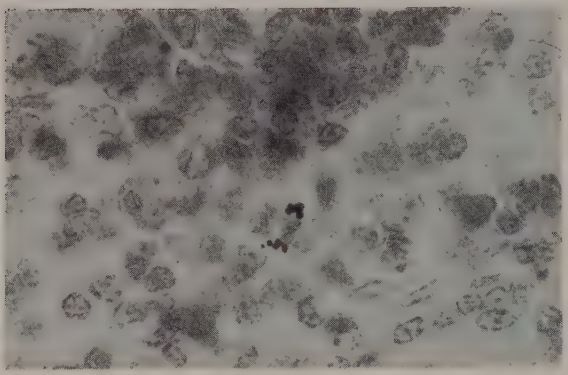


Photo 10. Rate de cobaye infesté avec des larves de *Trichinella spiralis*. Blocage à l'encre de Chine. Cellule réticulaire ayant englobé des particules d'encre de Chine. Microphotographie Oc. 10 Ob. 40. Coloration avec du carmin.

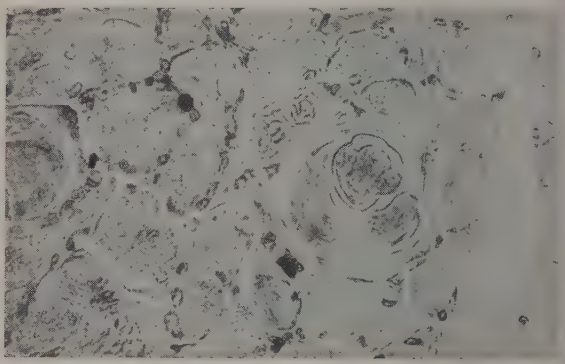


Photo 11. Cobaye infesté avec des larves de *Trichinella spiralis*. Blocage à l'encre de Chine. Dans le diaphragme on observe des larves enkystées de *Trichinella spiralis* et de fréquentes histiocytes qui ont englobé des particules d'encre de Chine. Microphotographie Oc. 10 Ob. 40. Coloration. avec du carmin.

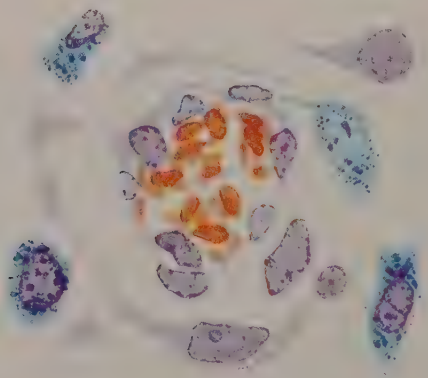


Photo 12. Poumon de cobaye infesté avec des larves de *Trichinella spiralis*. Blocage au bleu de trypan. Dans le tissu conjonctif de l'espace péribroncho-vasculaire juxtahilaire on observe des histiocytes qui ont intensivement atrocyté les granules de bleu de trypan.

Dessin d'après frottis. Coloration au carmin.

Les modifications histopathologiques chez les animaux de ce lot se caractérisent comme suit:

Intestin: infiltration leucocytaire du chorion avec mono- et polynucléaires qu'on observe chez tous les animaux examinés et qui est associée avec des lésions d'exulcération plus ou moins étendues de la muqueuse de l'intestin grêle dans la portion iléale terminale. Dans certains cas on remarque également la présence d'éosinophiles en quantité variable. Dans certains cas, on remarque une infiltration leucocytaire avec mononucléaires et polymorphonucléaires dans la sousmuqueuse ainsi que dans la couche musculaire, accompagnée d'une hyperplasie des éléments histiocytaires et par endroits des plasmocytes. Les histiocytes en atrocytose des granules de bleu de trypan ou de l'encre de Chine sont rares dans l'épaisseur des tuniques de l'intestin grêle.

Foie: degré accentué d'atrocytose des granules de bleu de trypan ou de l'encre de Chine avec prépondérance dans les cellules Kupffer (photo 1) et en proportion plus réduite dans les histiocytes des espaces Kiernan (photo 2). Les cellules Kupffer sont hyperplasiées et bourrées de granules fins ou grossiers de bleu de trypan. Les cellules cordonales hépatiques contiennent de même de multiples granules fins de bleu de trypan dispersés dans la masse cytoplasmatique. Le nombre des cellules hépatiques à deux noyaux est augmenté et par endroits on rencontre des aspects

Tableau I

Résultats des électrophorèses dans différentes phases de blocage des cobayes au bleu de trypan

Phase:	Lot « D » témoin infesté et non-bloqué				Lot « A » bloqué 8 jours avant l'infestation				Lot « B » infesté et bloqué simultanément				Lot « C » infesté et bloqué 8 jours après			
	albumines	α glob.	β glob.	γ glob.	albumines	α glob.	β glob.	γ glob.	albumines	α glob.	β glob.	γ glob.	albumines	α glob.	β glob.	γ glob.
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
précédant l'infestation	53,0	14,8	10,8	21,4	54,0	14,3	9,4	22,3	50,3	15,1	13,0	21,6	50,2	16,2	12,0	21,6
intestinale	50,2	16,5	12,5	20,8	35,7	22,9	16,2	25,2	39,5	22,6	13,5	24,4	43,2	22,4	13,2	21,2
sanguine	48,1	17,0	13,2	21,7	39,0	22,6	13,3	25,1	40,1	23,2	12,5	24,2	38,6	23,1	13,5	24,8
musculaire	37,6	21,9	14,2	26,3	36,8	23,3	14,1	25,8	41,4	22,4	10,6	25,6	39,4	22,9	12,5	25,2

Tableau II

Résultats des électrophorèses dans les différentes phases de blocage des cobayes à l'encre de chine

Phase :	Lot « D » témoin infesté et non-bloqué				Lot « A » bloqué 8 jours avant l'infestation				Lot « B » infesté et bloqué simultanément				Lot « C » infesté et bloqué 8 jours après			
	albumines	α glob.	β glob.	γ glob.	albumines	α glob.	β glob.	γ glob.	albumines	α glob.	β glob.	γ glob.	albumines	α glob.	β glob	γ glob.
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
précédant l'infestation	53,3	15,7	11,3	19,7	51,5	15,3	12,6	20,6	51,7	14,6	11,3	22,4	49,8	15,9	12,9	21,4
intestinale	44,4	21,1	11,2	23,3	33,3	23,8	10,7	32,2	37,4	22,5	12,8	27,3	35,8	22,2	12,4	29,6
sanguine	40,4	22,5	12,3	24,8	30,6	19,9	14,5	35,0	38,5	20,8	14,2	26,5	36,9	22,3	13,3	27,5
musculaire	39,8	20,4	13,6	26,2	33,0	21,1	11,3	34,6	40,6	22,2	11,9	25,3	36,3	20,2	11,7	31,8

altératifs cellulaires caractérisés par la dégénérescence granuleuse. Dans l'espace Kiernan on observe des infiltrations leucocytaires modérées avec prédominance des mononucléaires parmi lesquelles parfois des éosinophiles. Dans ces cas on constate des polymorphonucléaires aussi parmi les cellules des cordons de Remak du lobule hépatique.

Rate : dans tous les cas, une hyperplasie accentuée des éléments réticuloendothéliaux de la pulpe rouge. Parmi ces éléments en hyperplasie on observe de multiples éléments qui ont englobé massivement les granules de trypan ou d'encre de Chine (photo 9), ainsi que la présence de leucocytes éosinophiles. On remarque de même une vaso-dilatation accentuée (photo 9).

Reins : les éléments rénaux des tubes contorts sont remplis de granules de trypan, qu'on observe également dans leur lumen. Par endroits on observe aussi des histiocytes avec des granules de trypan situés dans le tissu conjonctif interstitiel.

Tissu musculaire : dans le diaphragme on observe de nombreuses larves de *Trichinella spiralis* encapsulées dans la masse musculaire. On constate une hyperplasie modérée des éléments histiocytaires et la présence de multiples histiocytes, qui ont incorporé massivement les granules de bleu de trypan ou d'encre de Chine. Afin d'illustrer l'intensité élevée de l'atrocytose dans les éléments histiocytaires du tissu conjonctif de l'organisme de l'animal, nous

présentons dans la photo 11, une préparation de poumon où l'on observe dans le tissu conjonctif d'un territoire bronchovasculaire juxta-hilaire de multiples histiocytes qui ont incorporé intensivement les granules de bleu de trypan.

Lot « B »

Chez le lot « B », dont l'infestation et le début du blocage ont lieu simultanément et par conséquent l'évolution de la phase intestinale est parallèle au blocage du système réticulo-endothélial, la densité des adultes en *phase intestinale* a été en moyenne de 35 femelles et 9 mâles (moyenne obtenue sur 7 cobayes).

Dans la *phase sanguine* la moyenne des embryons (6 cobayes) a été de 45 et dans la *phase musculaire* (de même 6 cobayes) la densité moyenne larvaire a été de 220.000.

Formule leucocytaire. Ainsi que chez le lot « A », les variations de la formule leucocytaire à signaler concernent toujours les basophiles, qui dépassent la limite supérieure normale (1—6,5%), atteignant le pourcentage de 8,5%, valeur où ils se maintiennent aussi dans la phase sanguine.

Du point de vue *clinique* les animaux de ce lot ont présenté les mêmes manifestations que celles du lot précédent, mais en mesure plus atténuée, la mortalité étant plus réduite et les complications pulmonaires moins fréquentes.

Les *réactions allergiques cutanées* effectuées avec le même antigène total lyophilisé et dans la même concentration (1:10.000) ne nous ont pas permis de tirer une conclusion pour la phase intestinale et sanguine, en raison des constatations susmentionnées; pour la phase musculaire, 3 cobayes de ce lot sur 6 testés réagissent en phase précoce (après 2 heures) et tardive (20 heures) par la formation de vésicules de dimensions presque similaires.

La *réaction de précipitation sur larves vivantes* modéremment positive dans la phase intestinale de l'infection, s'accentue progressivement dans les phases sanguine et musculaire.

Protéinémie. La détermination des protéines sériques indique une diminution moins marquée des sérum-albumines (moyenne 21,5%) simultanément avec une augmentation appréciable de la fraction α globulinique (moyenne 50%) et une augmentation moins accentuée des γ globulines (11%). Ces modifications s'installent dans la phase intestinale, leur valeur se maintenant, comme dans le cas précédent, au même niveau, pendant toute la durée de la maladie expérimentale. En ce qui concerne les β globulines, on ne constate point de variations significatives.

Les *modifications histopathologiques* chez les animaux de ce lot se manifestent également par des lésions intestinales, hépatiques, de la rate, des reins et du diaphragme, selon le type et le caractère de celles décrites chez le lot précédent. On constate, toutefois, une intensité plus marquée des lésions chez les animaux de ce lot. Ainsi:

Intestin: infiltration leucocytaire plus accentuée — les zones d'exulcération de la muqueuse plus étendues.

Foie: infiltration leucocytaire dans l'espace Kiernan plus accentuée; dans les lobules hépatiques on constate par endroits des îles de parenchyme hépatique avec tendance à la nécrose (photo 4). Par endroits on observe des zones avec infiltration graisseuse assez marquée. L'hyperplasie réticulo-endothéliale-kupfférienne est également plus accentuée que chez le lot précédent.

Rate: modifications morphologiques présentant les mêmes caractères, mais de moindre intensité que chez le lot précédent.

Reins: à part l'aspect structural décrit chez le lot précédent, on remarque des lésions d'intumescence dans les éléments cellulaires de la substance corticale. *Muscles* (diaphragme): modifications morphologiques présentant les mêmes caractères que le lot précédent, mais plus intenses.

Lot « C »

Analysant le comportement des cobayes du lot « C » bloqués 8 jours après l'infestation, donc vers la fin de l'évolution de la phase intestinale, moment où l'on considère que la plupart des embryons ont passé dans le torrent sanguin, nous obtenons les données suivantes: la densité moyenne des *Trichinella spiralis* adultes, en *phase intestinale* (6 cobayes) est de 96 femelles et 51 mâles, alors que la densité des embryons dans la *phase sanguine* (5 cobayes) est de 38; la densité moyenne larvaire, dans la *phase musculaire* (6 cobayes) s'élève au chiffre de 443.000 larves.

En ce qui concerne la *formule leucocytaire*, on ne constate pas de modifications, en dehors des limites larges normales établies.

Les *intradermoréactions* effectuées pour ce lot sur 5 cobayes, ont été négatives dans les phases intestinale et sanguine; dans la phase musculaire, les tests allergiques cutanés sont devenus positifs, à savoir 3 cobayes, dont 2 réagissant tant dans la phase précoce que dans la phase tardive, et un seul dans la phase précoce. Les réactions de type précoce ont présenté une réactivité locale plus intense.

La *réaction de précipitation sur larves vivantes* apparaît également dans la phase intestinale et s'intensifie progressivement jusqu'à la phase musculaire. En comparaison avec les autres lots « A » et « B », la réactivité a été plus faible.

Clinique. Contrairement aux lots « A » et « B », les symptômes cliniques sont sensiblement atténués et la mortalité très réduite; elle est généralement comparable à celle constatée chez le lot témoin, à symptômes cliniques presqu'inexistents.

Modifications histopathologiques. L'examen histopathologique des préparations de l'intestin, du foie, de la rate, des reins et du diaphragme a montré:

Intestin: infiltration accentuée avec mono et polynucléaires dans le chorion, la sous-muqueuse et même dans le tissu musculaire, par endroits des éosinophiles. On trouve également des histiocytes avec granules de bleu de trypan.

Foie: l'atrocytose de granules de bleu de trypan ou encre de Chine par les cellules Kupffer est accentuée. On constate une hyperplasie endothéliale accentuée, infiltration avec mononucléaires dans les espaces Kiernan (photo 8), rares éosinophiles et par endroits des zones de nécrose parenchymateuse.

Rate: hyperplasie accentuée réticulo-endothéliale et présence d'un grand nombre de cellules réticulaires et endothéliales des capillaires sinusoïdaux en atrocytose.

Muscles (diaphragme): on observe un grand nombre de larves enkystées et des zones de réaction évidente avec éléments histiocytaires, nombre d'entre eux se trouvant en atrocytose.

Toutes ces lésions sont plus accentuées que chez les lots précédents.

Protéinémie: Chez ce lot, la détermination des protéines sériques montre, pendant la phase intestinale, en comparaison avec les lots précédents, une plus faible

diminution des sérum-albumines (14%) et une augmentation relativement importante seulement de la fraction γ-globulinique (40%). La baisse des albumines sériques s'accentue dans la phase sanguine (22%). L'accroissement de la fraction α-globulinique se maintient approximativement au même niveau (43%). Cette phase marque aussi une augmentation de la fraction γ-globulinique (13%). Les modifications des protéines sériques se maintiennent à ce dernier niveau même dans la phase musculaire. Les β-globulines ne révèlent pas de variations significatives.

Lot « D » (témoin)

Poursuivant, chez le lot « D» (témoin) infesté avec la même dose de 1000 larves, mais non-bloqué, les phases évolutives de l'infestation ainsi que la réactivité de l'organisme — sur 4 cobayes pour chaque phase — on a constaté: une densité moyenne des adultes dans la *phase intestinale* de 45 femelles et 12 mâles; dans la *phase sanguine*, une moyenne de 27 pour les embryons, dans la *phase musculaire* la densité moyenne larvaire s'élevant à 645000 larves.

La *formule leucocytaire* a varié autour des limites procentuelles établies par KLIENEBERGER et DUMAS.

Les intradermoréactions ont été positives seulement dans la phase musculaire. Des 4 cas testés deux ont été positifs, tant dans la phase précoce que dans la phase tardive et deux — positifs seulement dans la phase précoce; les réactions de type précoce sont en général plus intenses.

Les *réactions de précipitation sur larves vivantes*, faiblement positives dans la phase intestinale, s'intensifient progressivement jusqu'à la phase musculaire où le précipité circumatrial est le plus abondant, demeurant toutefois inférieur du point de vue quantitatif par rapport à ceux qui se produisent chez les lots « A» et « B».

Les *aspects morphopathologiques* des sections de l'intestin, du foie, de la rate, des reins et du diaphragme montrent une intensité fortement accrue des lésions en comparaison avec les lots précédents. Ces lésions sont spécialement intenses dans le foie et le diaphragme. Ainsi, dans le foie les zones de nécrose parenchymateuse hépatique sont plus intenses et multiples (photo 7). Les zones avec infiltration et dégénérescence graisseuse couvrent presque entièrement le champ microscopique. Dans le diaphragme, le nombre des larves enkystées est plus grand et l'hyperplasie des éléments histiocytaires plus accentuée.

Protéinémie. La détermination des protéines sériques chez le lot témoin indique une diminution modérée, progressive de la fraction des sérum-albumines (6%, respectivement 10%). La diminution s'accentue brusquement dans la phase musculaire (30%) et atteint approximativement le niveau des valeurs observées chez les lots précédents. Dans les phases intestinale et sanguine on observe simultanément une augmentation correspondante des fractions α et β globuliniques, la fraction γ-globulinique oscillant entre les limites normales. Dans la phase musculaire on remarque, comme dans le cas des sérum-albumines, une variation brusque de toutes les fractions globuliniques, notamment une croissance de 48% des α-globulines, de 30% des β-globulines et de 23% des γ-globulines, par rapport aux valeurs moyennes normales des fractions respectives.

DISCUSSION

On accepte à présent l'opinion que l'immunité dans l'infection avec *Trichinella spiralis* chez le cobaye est due à un mécanisme défensif intestinal. Le mode de fonctionnement du mécanisme de l'immunité intestinale est encore peu connu. Bachmann et Molina (1933) sont d'avis que la réaction protectrice pourrait être dûe à une rétention d'anticorps et à une mobilisation locale des leucocytes et des éléments du système réticulo-endothélial dans la paroi intestinale de l'hôte. Bien que cette accumulation de leucocytes et de macrophages dans la paroi intestinale soit massive, Roth (1938) n'arrive pas à s'expliquer l'action de ces cellules sur les adultes mêmes (il ne s'agit pas des embryons). Mc Coy (1938) considère qu'il se produirait une réaction allergique pouvant constituer le facteur qui contribuerait à l'expulsion des adultes de l'organisme immun, sans toutefois les tuer. Cependant, ce problème n'est pas encore complèment élucidé et nécessite encore des investigations. Le problème de l'immunité ne doit pas être considéré comme une réaction strictement locale, l'intestin ne représentant que l'endroit où se manifeste une immunité qui est générale pour l'organisme entier (Mc Coy (1935), Matoff (1938), Roth (1939) et autres). Si l'on tient compte du fait que la réponse immunologique de l'organisme est étroitement liée à l'état fonctionnel du système réticulo-endothélial, son blocage devrait avoir comme conséquence l'inhibition d'une grande partie des possibilités de défense de l'organisme, par la réduction des anticorps spécifiques circulants et tissulaires. Une série d'aspects contradictoires de ce problème, constatés expérimentalement, imposent une analyse plus approfondie. Ainsi, les résultats des recherches effectuées, considérées dans leur ensemble et comparativement, prouvent que le degré d'immunité le plus élevé a été obtenu chez le lot « A» (120000 larves), qui a été infesté après le blocage du système réticulo-endothélial avec du bleu de trypan, blocage histologiquement évident. L'immunité a diminué progressivement chez le lot « B» (220.000 larves), chez lequel le début du blocage, ainsi que l'infestation avec des larves de *Trichinella spiralis*, ont été effectués simultanément; la dernière inoculation de la suspension colloïdale blocante coïncide à peu près avec la fin de la phase intestinale. L'immunité est encore plus faible chez le lot « C» (443.000 larves) qui a été bloqué 8 jours après l'infestation, date à laquelle nous considérons le cycle intestinal presque accompli. Enfin, le lot témoin « D» infesté et non-bloqué présente la plus faible immunité (645.000 larves). L'appréciation de l'immunité a été faite en considérant seulement les valeurs de la densité des *Trichinella spiralis* dans la phase musculaire, sans tenir compte des aspects cliniques (hérissement des poils, inapétance, perte de poids, prostration dont la représentation graphique donnerait une courbe diamétralement opposée à la première).

Etant donné que la méthode du dénombrement des adultes de l'intestin et des embryons du circuit sanguin n'est pas rigoureusement exacte (impossibilité de surprendre le moment précis de la densité maximum des phases évolutives), nous avons considéré, ainsi que Campbell (1955), que l'appréciation du degré d'immunité par les valeurs des densités larvaires dans la musculature est beaucoup plus exacte et concluente. Quant à l'éosinophilie du sang périphérique on n'a pas remarqué de modifications importantes, ainsi qu'on devait s'y attendre au cours d'une trichinellose. D'ailleurs, de nombreux auteurs ont signalé l'inconstance réactive des éosinophiles dans la trichinellose expérimentale (Drake,

1902 ; Burnett 1917). Récemment, Belding a précisé qu'il n'y a pas une corrélation entre la présence des anticorps et l'éosinophilie et que le pourcentage des éosinophiles est inversement proportionnel à la gravité de la maladie, étant élevé dans les formes légères et réduit, ou même absent, dans les formes avec symptômes graves.

Les réactions allergiques cutanées avec apparition de vésicules ont été négatives dans les phases intestinale et sanguine et positives dans la phase musculaire. Les intradermoréactions ont été de type précoce (1 -2 heures), de type tardif (20 heures) ou bien ont revêtu les deux aspects — précoce et tardif. La réaction allergique cutanée dépend de la présence des anticorps fixes et circulants qui réagissent avec l'antigène larvaire. L'aspect et l'intensité de l'I.D.R. dépend de la période écoulée entre l'infestation du sujet et l'espèce sur laquelle on a expérimenté (Maternowska). Plus l'infestation est ancienne, plus l'intradermoréaction est nette et caractéristique, en particulier chez l'homme et le cobaye. Dans la trichinellose, la réaction de type précoce représente un standard pour le diagnostic; elle peut devenir positive 11 à 14 jours à partir de l'infestation, étant d'habitude évidente le 17-e jour, par conséquent dans une phase plus tardive de la maladie. La réaction tardive apparaît dans la phase précoce; dans les cas de maladie plus ancienne (jusqu'à 7 semaines) on enregistre les deux réactions (Belding, Augustin).

Une des explications possibles sur les différences observées expérimentalement, serait la variabilité de la réponse de l'hôte à l'excitation antigénique.

L'intensité de la réaction de précipitation sur larves vivantes par la formation de précipités circumatriaux a été progressive — faible dans la phase intestinale et s'intensifiant vers la phase musculaire.

A notre connaissance, l'apparition des anticorps est signalée dans la littérature 30 jours après l'infection, avec un développement maximum entre le 50—60-e jour. Dans les conditions expérimentales de nos recherches nous avons constaté beaucoup plus tôt l'apparition de ces anticorps, respectivement déjà à la fin de la phase intestinale, bien entendu en proportion réduite, ainsi qu'il résulte aussi de la quantité de précipité circumatrial formé.

Bien que surprenants, les résultats obtenus pourraient trouver une explication par nos propres expériences ainsi que par certaines données de la littérature. Différents auteurs, dans leurs études, ont utilisé deux méthodes d'investigation: la splénectomie et le blocage. Les résultats obtenus par le blocage du système réticulo-endothélial (s.r.e.) sont contradictoires : certains auteurs constatent une diminution des anticorps, d'autres n'observent pas ces modifications et il y en a d'autres qui signalent une hausse des anticorps; toutes ces données sont étroitement liées à la dose de substance colloïdale électro-négative injectée, les substances modificatrices du s.r.e. produisant un effet stimulant ou blocant selon la dose inoculée. Si la dose de colloïde est insuffisante elle a comme résultat une hyperfonction du s.r.e.; si elle est forte le résultat obtenu est dépressif. Les fortes doses de substances blocantes affectent l'activité des cellules du s.r.e., produisant des phénomènes compensateurs qui neutralisent partiellement ou en totalité les effets du blocage; parfois elles arrivent à dépasser leur but, provoquant une hyperactivité (Gérard). Bien plus, on a constaté que des doses d'encre de Chine sûrement blocantes pour le lapin normal, devenaient insuffisantes pour les animaux présentant un s.r.e. en état de hyperfonction,

crée par l'inoculation de bacilles typhiques (Dieryck). Cette insuffisance de blocage peut s'expliquer par l'excitation du S.R.E. Il paraît que sous l'influence d'une infection les animaux infestés présentent une résistance accrue au blocage par rapport aux cobayes normaux, ce qui expliquerait certaines contradictions des expériences précédentes (Dieryck). Ces observations constatées à la suite de recherches bactériologiques, pourraient être également valables dans la parasitologie. En ce qui concerne nos recherches, on aurait pu suspecter aussi la toxicité du colloïde utilisé — bleu de trypan. Afin d'éliminer cette supposition, nous avons repris les expériences remplaçant le bleu de trypan par l'encre de Chine. Les valeurs obtenues concernant la densité parasitaire, la formule leucocytaire, les réactions immunologiques ainsi que l'aspect clinique de toutes les phases d'évolution chez les lots bloqués avec de l'encre de Chine, n'ont présenté que des modifications quantitatives par rapport à celles constatées chez les animaux bloqués avec du trypan, de sorte que la représentation graphique montrerait des courbes très proches.

Du point de vue histopathologique les lésions de l'intestin, du foie, de la rate et du diaphragme présentent pour chaque lot les modifications caractéristiques pour l'infection à *Trichinella spiralis*, décrites plus haut chez les lots infestés et bloqués avec du bleu de trypan. Ces lésions sont plus réduites comme intensité chez les animaux bloqués avec de l'encre de Chine, par rapport aux lésions constatées chez les animaux bloqués avec du bleu de trypan, présentant néanmoins dans leur ensemble les mêmes caractères; lésions plus accentuées chez les animaux du lot témoin et des lots bloqués après l'infestation et moins accentuées chez les cobayes des lots bloqués avant l'infestation ou simultanément.

Afin d'illustrer l'intensité du blocage des éléments réticulo-endothéliaux avec des colorants électro-négatifs, nous présentons une série d'images microphotographiques, en particulier celles des expériences avec de l'encre de Chine qui bloque de manière élective les éléments réticulo-endothéliaux. Le blocage avec du bleu de trypan, qui ne se limite pas aux éléments réticulo-endothéliaux, pénétrant également dans les éléments parenchymateux hépatiques et rénaux, est présenté par l'image microphotographique en couleurs, où l'on observe l'atrocytose intensive des granules de bleu de trypan par les histiocytes du tissu conjonctif péribronchique.

En résumé, les animaux infestés avec des larves de *Trichinella spiralis* et bloqués soit avec du bleu de trypan, soit avec de l'encre de Chine, ont présenté les caractéristiques réactives suivantes. Les modifications histopathologiques altératives caractéristiques à l'infestation de l'organisme animal avec la *Trichinella spiralis* ont été les plus réduites comme intensité chez le lot « A », concordant avec les valeurs des densités parasitaires, également plus réduites chez les animaux de ce lot. Le lot témoin « D », infesté et non-bloqué présente des modifications hispathologiques plus accentuées, en concordance avec la densité parasitaire accrue; le pourcentage des γ-globulines est augmenté chez le lot témoin par rapport à ceux bloqués par le bleu de trypan. Par conséquent, le blocage au bleu de trypan semble déterminer une γ-globulinogenèse plus réduite.

Chez les animaux bloqués avec de l'encre de Chine, de même que pendant le blocage au bleu de trypan, la disprotéinémie s'installe brusquement déjà dans

la phase intestinale de l'infection; les valeurs procentuelles des diminutions ou des augmentations des différentes fractions se maintiennent au même niveau pendant toute la durée de l'évolution de la maladie expérimentale.

Contrairement au blocage au bleu de trypan, celui à l'encre de Chine n'influence pas la globulinogenèse, montrant même une action stimulante s'il est effectué 8 jours avant l'infestation. Ce phénomène pourrait trouver son explication dans le manque de toxicité de l'encre de Chine.

La fraction α-globulinique est toujours considérablement accrue dans les deux méthodes de blocage. L'augmentation des β-globulines est inconstante et semble non-significative. Quant aux sérum-albumines, elles marquent une diminution correspondante évidente. La valeur des variations des protéines sériques ne pourra être éclaircie que par l'étude immuno-électrophorétique qui sera exécutée ultérieurement.

Les valeurs procentuelles des fractions électrophorétiques des protéines sériques pendant le blocage du S.R.E. à l'encre de Chine sont présentées dans le tableau II.

Ainsi que les autres données expérimentales, les résultats sur la disprotéinémie prouvent que la capacité de réaction de l'organisme ne se limite pas seulement aux possibilités de réactions du S.R.E.

Dans ce sens, nous soulignons certains aspects particuliers et notamment:

— le tableau clinique des animaux bloqués et infestés (en premier lieu ceux du lot « A » bloqué d'abord, infesté ensuite) prouve une altération plus nette que chez les animaux témoins ou ceux bloqués après l'infestation;

— ce fait ne concorde pas avec les données de la littérature selon lesquelles le blocage du S.R.E. accentue les modifications cliniques de l'organisme comme conséquence de l'invasion avec des germes pathogènes, tandis que nos résultats prouvent que le blocage du S.R.E., tout en intensifiant les modifications cliniques, est accompagné d'une diminution de l'invasion de l'organisme par des larves de *Trichinella spiralis*;

— la réponse de l'organisme des animaux infestés et bloqués à divers moments par rapport à la date de l'infestation a présenté des aspects cliniques, parasitologiques, tissulaires et biochimiques à caractères particuliers et inattendus, qui restent à être précisés par des recherches ultérieures.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Dans le présent travail les auteurs se sont proposé d'étudier le rôle du système réticulo-endothélial dans le développement de l'immunité dans la trichinellose.

Dans ce but on a bloqué le système réticulo-endothélial à certains moments de l'évolution de la maladie, étroitement liés aux phases de l'évolution de l'agent pathogène — la *Trichinella spiralis*, enregistrant les modifications survenues par l'infestation de l'organisme avec ce parasite (appréciation des densités intestinales, sanguines et musculaires), ainsi que les modifications sérologiques, biochimiques et tissulaires, apparaissant à la suite de l'infestation et du blocage de l'organisme.

A cette fin on a injecté avec du bleu de trypan 1%, trois lots de cobayes, comme suit:

Le lot « A », bloqué avant l'infestation;
Le lot « B », bloqué simultanément avec l'infestation;
Le lot « C », bloqué après l'infestation;
Un quatrième lot « D », infesté et non-bloqué a servi comme témoin.

Afin de vérifier l'éventuelle nocivité du bleu de trypan on a répété les expériences en le remplaçant par un autre colorant électro-négatif — l'encre de Chine — administré dans les mêmes conditions et quantités.

De l'analyse du matériel étudié se dégagent les aspects suivants:

— la densité parasitaire a été d'intensité plus réduite chez les animaux bloqués d'abord et infestés ensuite, étant fortement augmentée chez les animaux infestés et non-bloqués; par conséquent, la densité larvaire a été d'autant plus réduite que le blocage était plus précoce, ainsi:

les animaux qui ont été bloqués et infestés simultanément (lot « B ») ont présenté une densité parasitaire augmentée par rapport aux animaux d'abord bloqués et ensuite infestés (lot « A »); l'infestation a été plus massive chez le lot « C », infesté d'abord et bloqué ensuite, que chez les animaux bloqués et infestés simultanément (lot « B »).

Quant à la dynamique des anticorps, les réactions de précipitation sur larves vivantes ont été positives chez tous les lots, dès la phase intestinale.

Les modifications histopathologiques ont été parallèles à la courbe de la densité parasitaire - les lésions tissulaires, intestinales, hépatiques et musculaires étant manifestes chez tous les lots, mais augmentées en intensité par rapport à la densité larvaire et notamment:

— infiltrations leucocytaires intestinales;

— lésions infiltratives leucocytaires dans le foie avec hyperplasie réticulo-endothéliale, altérations des éléments des cordons cellulaires hépatiques ou même des îles de nécrose, de nombreuses larves enkystées dans les muscles; ces aspects tissulaires ont été plus accentués chez les lots de cobayes non-bloqués (« D ») ou bloqués après l'infestation (« C »).

Les altérations histopathologiques sont intenses aussi chez le lot bloqué avant l'infestation (« A »), sans présenter toutefois dans l'ensemble l'intensité des modifications observées chez les lots « D » et « C ».

Les variations procentuelles des fractions électrophorétiques des protéines sériques montrent constamment une augmentation importante des α-globulines. Les β-globulines ne semblent pas présenter de variations significatives. Les γ-globulines marquent une augmentation importante seulement chez les animaux témoins, non-bloqués et chez les animaux bloqués à l'encre de Chine. Chez les cobayes bloqués au bleu de trypan, la hausse des γ-globulines est plus réduite.

Du point de vue clinique, les animaux du lot bloqué antérieurement à l'infestation présentaient un état d'altération plus accentué que les animaux des autres lots (perte de poids, somnolence ou même adynamie); il en est de même en ce qui concerne le pourcentage des complications pulmonaires (bronchopneumonies), provoquant la mort.

La réponse de l'organisme des animaux d'expérience infestés et bloqués à divers moments par rapport à la date de l'infestation, a présenté des aspects cliniques, parasitologiques, tissulaires et biochimiques, à caractère particulier et inattendu, qui restent à être precisés par des recherches ultérieures.

BIBLIOGRAPHIE

1. Aschoff L. — Verh. d. dtsch. Path. Ges., 1913, **16,** 107
2. Bachmann G. W. et Molina R. — Am. J. Hyg., 1933, **2;** 266.
3. Bachmann G. W. et Gonzales J. O. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1936, **35,** 215
4. Benassi — Arch. d. Pat. et Clin. Med., 1926, **5, 246**
5. Burnett S. H. — Clinical Path. of the Blood, second Ed., 1917, 166
6. Campbell C. H. — J. Parasit., 1955, **41,** 483.
7. Collon N. G. — Arch. Int. Méd. Expérim. 1927, **3,** 273
8. Dieryck J. — Rev. Belge de Sc. Med., 1929, **1, 167**
9. Drake A. K. — J. Med. Res., 1902, **8,** 255
10. Ducas R. — Thèse Jouve Elie Paris, 1921, 47
11. Dustin A. P. — Arch. Int. de Méd. Expér. (Liège), 1927, **3,** 681
12. Dumas J. — Les animaux de laboratoires, Paris, Flammarion, 1953
13. Geller M. — Ztschr. Parasiten, 1933, **5,** 370.
14. Jahontova N. — Archiv. f. experm. Zellforsch., 1930, **9,** 142.
15. Klienebeger K. — Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere, Leipzig 1907.
16. Matoff K. — Ztsch. Infkr. Parasitenkrank. Hyg. Haustiere, 1938, **54,** 116.
17. Mc Coy O. R. — Am J. Hyg., 1935, **21,** 200.
18. Mc Coy O. R. — Journ. Parasit., 1938, **24,** suppl. 35.
19. Mc Coy O. R. — Am. J. Hyg., **14,** 484.
20. Roth H. — Am J. Hyg., 1938, **28,** 85.
21. Roth H. — Am. J. Hyg., 1939, **30** (2 section D), 35.
22. Salzer B. F. — J.A.M.A., 1916, **67,** 579.
23. Taliaferro W. H. — Physiol. Rev., 1940, **20,** 469.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ РЕТИКУЛО-ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТРИХИНЕЛЛОЗЕ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Авторы исследовали роль ретикуло-эндотелиальной системы при наступлении иммунитета в отношении экспериментального трихинеллоза на группах морских свинок без блокады, а также с блокадой вызванной синим трипаном и китайской тушью.

Было установлено следующее:

— паразитарная плотность дала меньшие значения в группах животных, у которых блокада была осуществлена раньше;

— динамика антител, исследованная при помощи реакции преципитации на живых личинках оказалась положительной еще в кишечной стадии у животных всех групп;

— интенсивность патогистологических и биохимических изменений возрастала параллельно с значениями плотности личинок. В отношении клинической картины можно сказать, что плохое состояние было более выражено у животных, входивших в группы, подвергшиеся более ранней блокаде.

Ответные реакции организма подопытных зараженных животных с блокадой, осуществленной в различные моменты — в зависимости от срока заражения — дали различные клинические и различные паразитологические картины, а также и различные картины тканевой и биохимической реактивности, с особыми и неожиданными признаками, которые будут уточнены в последующих исследованиях.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ROLLE DES RETIKULOENDOTHELIALEN SYSTEMS BEI DER EXPERIMENTELLEN TRICHINOSE

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser untersuchten die Rolle des retikuloendothelialen Systems in der Entstehung der Immunität bei experimenteller Trichinellose, an normalen Meerschweinchen und an solchen die einer Blockierung mit Trypanblau oder Tusche unterzogen wurden.

Es wurde folgendes festgestellt:

— Bei Gruppen, bei welchen die Blockierung früher durchgeführt wurde, war die Parasitendichte geringer.

— Bei allen Meerschweinchengruppen war die durch Präzipitinreaktionen an lebende Larven verfolgte Antikörperdynamik noch während der Darmphase positiv.

— Das Ausmass der histopathologischen und der biochemischen Veränderungen ging der Larvendichte parallel. Was die klinischen Zustandsbilder anbetrifft, waren aber die Störungen bei den der Blockierung führer unterzogenen Meerschweinchengruppe ausgeprägter.

Die Körperreaktion der infestierten und im Verhältnis zum Moment der Infestierung zu verschiedenen Zeitpunkten blockierten Tiere wies in klinischer, parasitologischer und biochemischen Hinsicht sowie was die Gewebeveränderungen anbetrifft, besondere und unerwartete Eigentümlichkeiten auf, die in zukünftigen Untersuchungen genauer bestimmt werden sollen.

INVESTIGATIONS CONCERNING THE PART PLAYED BY THE RETICULO-ENDOTHELIAL SYSTEM IN EXPERIMENTAL TRICHINOSIS.

SUMMARY

The authors have investigated the part played by the reticulo-endothelial system in the onset of immunity in experimental trichinellosis. The investigations were carried out in group of guinea-pigs whose R.E.S. had not been blocked or had been blocked with trypan blue or India ink.

The following findings were made:

— Density of the parasites was lower in the groups in which blocking had been performed at an earlier moment.

— Antibody dynamics, as followed up by means of precipitation reactions on living larvae, were positive as early as during the intestinal phase in all groups of guinea-pigs.

— The intensity of histopathological and biochemical alterations paralleled the density of the larvae. As regards the clinical pattern, the condition was nevertheless more conspiciously altered in the groups subjected to earlier blocking.

The reactions in experimental animals infested and blocked at various moments in relation to the moment of infestation displayed quite peculiar and unexpected clinical, parasitological, tissular responsiveness, and biochemical patterns which are to be subsequently investigated.

ACTIVITÉ DE CERTAINS PHAGES ISOLÉS DU SOL OU DE SOUCHES LYSOGÈNES DE *B. CEREUS* SUR DIFFÉRENTES SOUCHES DE BACILLES AÉROBIES SPORULÉS ET EN PARTICULIER SUR LES *B. ANTHRACIS*, *B. CEREUS* ET *B. MYCOIDES*

par

N. Stamatin et S. Anghelesco

(Travail du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Bucarest et du Centre National de Phages-Références — Bucarest)

— Manuscrit reçu le 17 février 1961 —

Ainsi que l'ont montré Ivanovics et Lantos (1958), Stamatin et Li Van Sob (1959), on peut facilement isoler du sol des phages actifs, en particulier envers le *B. anthracis*, et qui furent nommés, pour cette raison, phages « *anthrax* » (Lantos et coll., 1960).

La reprise de ces recherches nous a permis de confirmer en tous points ces premières données. En effet, nous avons isolé de différents échantillons du sol 15 souches de phages, qui furent examinés du point de vue de leur activité sur diverses espèces de bacilles aérobies sporulés. En plus, nous avons examiné 8 phages, également isolés du sol par Ivanovics et Lantos (1958), ainsi que les phages alpha, bêta, isolés par McCloy (1951, 1958) à partir de la souche lysogène w du *B. cereus*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les *souches de phages* utilisées dans nos recherches ont été les suivantes:

— phage E — isolé d'un échantillon de sol récolté d'un jardin publique de Bucarest, en mars 1958;

— phage F — idem, en juin 1959;

— phage F_5 — une variante du phage F;

— phages H, R et O — isolés d'un échantillon de sol récolté d'un jardin publique de Bucarest, en julliet 1959;

— phages 500 et Cu — idem, en août 1959;

— phage K — isolé d'un echantillon de sol récolté d'un jardin publique de Kichinev (URSS), en septembre 1959;

— phage G — isolé d'une souche lysogène de *B. cereus*, provenant d'un échantillon de sol récolté d'un jardin publique de Kiev (URSS) en septembre 1959;

— phage B — isolé du sol d'un jardin publique de Bucarest en octobre 1959;

— phage Z — idem, en août, 1960;

— phages Tc, S et Tu — idem, en septembre 1960;

— phages α et β — isolés par McCloy;

— phages 26 cs, 26 cr, 26 tl, 27 cr, 27 tl, 28 cg, 28 tlcg et 29 cg, gracieusement mis à notre disposition par le Prof. IVANOVICS, auquel nous adressons, par cette voie, nos sincères remerciements.

Les souches bactériennes utilisées ont été:

B. anthracis	156 souches
B. cereus	73 souches
B. subtilis	24 souches
B. megatherium	14 souches
B. mycoides	5 souches

Ces souches proviennent de la collection du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Bucarest. Leurs espèces ont été déterminées par les tests courants. La plupart des souches de *B. cereus* ont été isolées des mêmes échantillons de sol desquels on a isolé les phages.

Milieux de culture: — *milieu liquide* — bouillon peptoné, préparé à partir de l'extrait de viande de cheval ou de bœuf, pH = 7,2—7,6; *milieu solide* — gélose préparée avec extrait de viande de cheval ou de bœuf.

Technique de travail: 1. *Isolement des phages*: Environ 1 g de sol est mis en 20—30 ml bouillon; après incubation de 2—3 jours à la température de la chambre, une partie du surnageant est filtrée et le reste réchauffé 10 minutes à 80°C. Le filtrat sert au décèlement du phage, par l'emploi de la souche-test 1398T, phénotypique, asporogène, sensible aux phages (décrite antérieurement par STAMATIN et LI VAN SOB, 1959). A partir du milieu réchauffé, on fait des cultures en boîtes avec agar, en vue d'identifier la flore aérobie sporulée. Dans la majorité des échantillons de sol examinés, nous avons trouvé le *B. cereus* parfois le *B. mycoides*, ainsi que divers bacilles aérobies sporulés (qui n'ont pas été identifiés).

2. *Détermination de l'activité des phages*. Dans ce but, on a employé la méthode courante sur gélose en boîtes. La culture était ensemencée à différents endroits, préalablement marqués; après séchage à l'étuve on ajoutait au centre de la zone ensemencée une goutte de phage non-dilué.

RÉSULTATS

A. Les résultats du test phagique des souches bactériennes décrites sont resumés dans le tableau I.

Des données du tableau I, il résulte:

1. Tous les phages ont été actifs envers le *B. anthracis;* toutefois, le nombre des souches sensibles a varié largement d'un phage à l'autre. Ainsi, le phage E a lysé toutes les 156 souches de *B. anthracis*, tandis que les phages Cu, 500 et S n'ont lysé respectivement que 9, 34 et 14 souches. Les autres phages ont occupé une situation intermédiaire, aucun n'égalant le phage E.

2. Envers le *B. cereus*, la plupart des phages étudiés ont été actifs; néanmoins, pour cette espèce aussi, la proportion des souches sensibles a varié d'un phage à l'autre. Par exemple, les phages alpha et bêta ont été inactifs envers toutes les 73 souches étudiées, les phages H, E, F, 26 es, 26 cr, 28 cg, etc. lysant un nombre important de souches. Les variantes phénotypiques asporogènes de *B. cereus*, contrairement aux souches correspondantes de *B. anthracis* (CIUCA et coll., 1959), ne sont pas plus sensibles aux phages que les souches sporogènes.

Tableau I

Action du « phage cereus » envers les différentes souches des espèces de bacilles aérobies sporulés

Souches	Espèce des bacilles				
	B.anthracis	B.cereus	B.mycoides	B.subtilis	B.megatherium
alpha	144*/149**	0/69	0/4	0/24	0/14
bêta	143/149	0/69	0/4	0/24	0/14
E	156/156	16/73	1/5	—***	0/10
F	129/156	18/73	2/5	—	0/10
F_5	123/156	3/73	0/5	—	0/10
R	112/156	25/73	0/5	—	0/10
O	120/156	3/73	0/5	—	0/10
H	120/156	32/73	3/5	—	0/10
500	34/156	20/73	2/5	—	0/10
Cu	9/156	15/13	1/5	—	0/10
K	61/156	15/73	2/5	—	0/10
B	52/156	12/68	0/5	—	0/10
G	41/156	1/68	0/3	—	0/12
Z	36/66	1/5	—	—	—
Tu	143/149	5/69	0/4	0/24	0/14
Tc	131/149	6/69	0/4	0/24	0/14
S	14/149	1/69	0/4	0/24	0/14
26 cs	134/149	21/69	1/4	0/24	0/14
26 cr	128/149	17/69	1/4	0/24	0/14
26 tl	90/149	16/69	1/4	0/24	0/14
27 cr	115/149	3/69	1/4	0/24	0/14
27 tl	110/149	13/69	1/4	0/24	0/14
28 cg	126/149	17/69	1/4	0/24	0/14
28 tl cg	129/149	15/69	1/4	0/24	0/14
29 cg	120/149	13/69	1/4	0/24	0/14

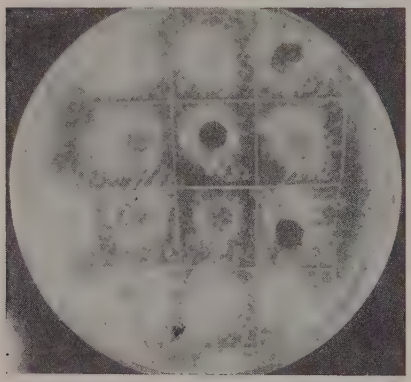
* nombre de souches sensibles
** nombre de souches examinées
*** souches non-testées

3. Des 5 souches de *B. mycoides*, une s'est avérée résistante envers tous les phages que nous avons eus à notre disposition. Le phage H s'est montré le plus actif envers cette espèce, lysant 3 souches sur 5 examinées.

4. Les souches de *B. subtilis* et *B. megatherium* ont toutes été insensibles aux phages testés. De même, un phage subtilis (c), isolé d'une souche lysogène, a été inactif envers toutes les souches de *B. anthracis* et de *B. cereus* examinées.

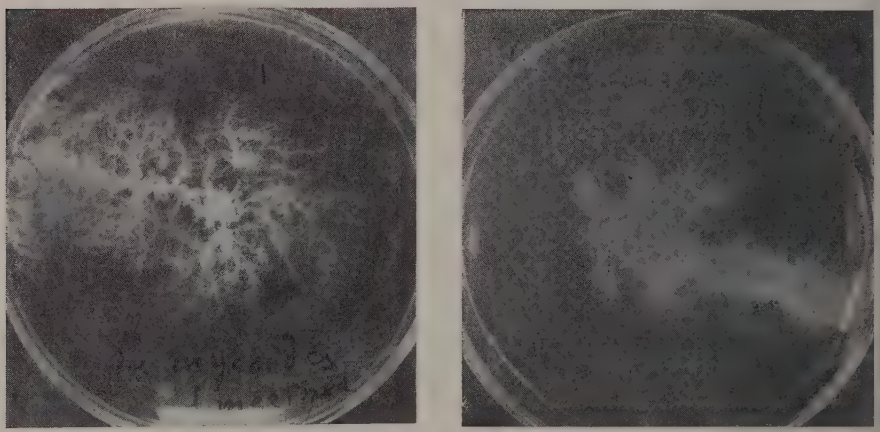
B. *Quelle serait l'explication de la réceptivité des B. anthracis, B. cereus et B. mycoides envers les mêmes phages?* La réceptivité des trois espèces bactériennes envers la même souche de phage s'explique par leur parenté structurale, fait d'ailleurs également observé par SMITH et coll. (1946). Le filtrat obtenu dans les conditions montrées et employé dans nos expériences ne représente pas une mixture de phages, dont les uns actifs envers le *B. anthracis* et le reste envers le *B. cereus* ou *B. mycoides*; en effet, nous n'avons pas réussi à obtenir du phage F une souche active seulement envers le *B. cereus* et ni par passages répétés et multiples sur *B. anthracis*, un phage actif uniquement envers cette

espèce. A remarquer que, si toutes les trois espèces sont sensibles envers le même phage, leur comportement est différent. Ainsi, le *B. cereus* est, en général, moins sensible que le *B. anthracis*, le phage ne produisant que rarement une lyse totale de la culture en bouillon du *B. cereus* et donnant fréquemment une telle lyse chez le *B. anthracis*. Cependant, sur gélose, les phages non-dilués donnent fréquemment la lyse totale de certaines souches de *B. cereus*.



Photographie 1. — Activité de différents phages sur la souche de *B. mycoides 2532*.

Quant au *B. mycoides*, les phages actifs donnent sur gélose une lyse confluente; néanmoins, le phage ne se multiplie point et son comportement envers cette espèce semble être celui d'un phage défectif (photo 1). L'étude des relations entre le phage et le *B. mycoides*, nous a permis de constater que les germes développés dans la zone de la lyse phagique revêtent les caractères de culture de l'espèce *B. cereus :* en gélose ils ne forment plus de colonies à aspect rhizoïde (photo 2), s'homogénisent facilement dans l'eau et troublent le bouillon. Les cultures de type *cereus* ainsi isolées demeurent sensibles au phage, mais, de même que la souche d'origine, ne le multiplient point. Nous rappelons que Smith (1957), par d'autres procédés, a réussi à transformer le *B. mycoides* en *B. cereus*. Cette transformation se réfère aux caractères de culture, la souche, ainsi que nous l'avons déjà mentionné, gardant de même que le *B. mycoides*, la propriété de ne pas multiplier le phage.



Photographie 2. — A gauche: souche de *B. mycoides* J en culture sur gélose; à droite: variante présentant les caractères de culture de *B. cereus*, isolée de la souche *B. mycoides* J.

C. *L'origine des phages dans le sol.* La grande majorité des phages examinés, proviennent du sol, où ils se multiplient sur des souches de *B. cereus* et non de *B. anthracis.* A l'appui de cette affirmation, nous présentons les arguments suivants:

1. Le *B. cereus* est un bacille du sol, dans le sens qu'on peut l'isoler de n'importe quel sol. Par contre, le *B. anthracis*, ainsi que l'ont précisé PASTEUR (1881), PASTEUR et coll. (1881), n'est pas proprement dit un bacille tellurique, ne pouvant être isolé que de certains endroits et de certains matériaux (cailloux, morceaux de marbre, etc.) qui permettent sa conservation sous la forme de spores. Il est pratiquement absent des sols agricoles; nous-mêmes n'avons pas réussi à l'isoler des échantillons étudiés pour la présence du phage.

2. Certaines souches de *B. cereus* isolées du sol sont lysogènes, libérant le phage, sans que l'intervention de moyens spéciaux d'induction soit nécessaire. Par contre, nous n'avons réussi à isoler aucune souche lysogène de *B. anthracis* des animaux morts d'anthrax et même dans des conditions expérimentales, la lysogénéisation de cette espèce est assez difficile.

3. Certaines souches de *B. cereus* sont résistantes à tous les phages testés, tandis que toutes les souches de *B. antharcis* ont été sensibles envers un ou plusieurs phages, ce qui nous fait supposer que le phénomène est en relation avec l'existence de la lysogénie chez le *B. cereus* et son absence chez le *B. anthracis.*

4. Les phages isolés du sol, qui sont actifs envers les *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. mycoides* doivent être considérés et par conséquent désignés, comme étant des phages « *cereus* ».

CONCLUSIONS

1. Les sols, et en particulier ceux auxquels on a récemment ajouté des engrais organiques, contiennent — pendant les mois chauds — presque constamment des phages actifs envers les *B. cereus*, *B. anthracis* et *B. mycoides.* L'activité des différentes souches de phages envers les souches des trois espèces bactériennes mentionnées, varie dans de larges limites. Une seule souche (E) a été active envers les 156 souches de *B. anthracis* étudiées, lysant en même temps 16 souches sur 73 de B. *cereus.*

2. Ces phages se multiplient dans le sol sur des souches de *B. cereus*, fait démontré par le caractère ubiquitaire de ce bacille — ce qui n'est guère valable pour le *B. anthracis* — aussi bien que par l'existence dans le sol de certaines souches lysogènes de *B. cereus.*

3. Pour les raisons exposées, nous proposons pour ce phage le nom de « *phage cereus* ».

4. Le fait que le phage cereus est actif tant vis-à-vis du *B. cereus*, que vis-à-vis des *B. anthracis* et *B. mycoides* et que par passages par *B. cereus* ou *B. anthracis* on n'obtient pas un phage monovalent, prouve qu'entre les trois espèces il existe, ainsi que l'ont d'ailleurs affirmé SMITH et coll. (1946), des étroites relations philogénétiques. Toutefois, nous considérons que des raisons d'ordre pratique s'opposent à la fusion des trois espèces en une seule.

5. Les souches de *B. anthracis* et de *B. cereus* sont lysées et multiplient le phage, tandis que celles de *B. mycoides*, bien que lysées, ne le multiplient point. Les cultures de *B. mycoides* isolées des zones de lyse produites sur gélose

par le « *phage cereus* » revêtent les caractères de culture de l'espèce *B. cereus*, mais diffèrent de celui-ci par le fait qu'elles ne multiplient point le phage qui les lyse, leur comportement étant donc identique à celui de la souche d'origine,

6. Certains « *phages cereus* », ainsi que l'ont montré divers auteurs (McCloy 1951, Seidel, 1957, Ciuca et coll., 1959) possèdent un degré élevé de spécificité, pouvant servir au diagnostic rapide des souches de *B. anthracis*. Le test phagique est à recommander, mais seulement associé à l'examen de la mobilité et éventuellement d'autres caractères, étant donné que certaines souches de *B. cereus* peuvent également en être sensibles.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ciuca M. et coll. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 9.
2. Ciuca M. et coll. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 169.
3. Ivanovics G. et Lantos J. — Acta Microbiol. Acad. Sc. Hung., 1958, **5**, 405.
4. Lantos J. et coll. — Acta Microbiol. Acad. Sc. Hung., 1960, **7**, 31.
5. Mc Cloy W. E. — J. Hyg., 1951, **49**, 114.
6. Mc Cloy W. E. — J. Gen. Microbiol., 1958, **18**, 198.
7. Pasteur L. — Bull. Acad. Méd., 1881, **10**, 144.
8. Pasteur L. et coll. — Bull. Acad. Méd., 1881, **10**, 308.
9. Seidel G. — Coll. Wernigerode, Oct. 1957.
10. Smith N. R. et coll. — Aerobic mesophilic sporeforming bacteria. Misc. Publ. U. S. Dept. Agric. No. 559, Washington, D. C., 1946.
11. Smith N. R. et Gordon E. R. — Genus Bacillus, dans « Bergey's Manual of determinative bacteriology » 3-d éd., 1957, Baltimore, p. 613.
12. Stamatin N. et Li Van Sob — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 31.

АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФАГОВ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВЫ ИЛИ ЖЕ ИЗ ЛИЗОГЕННЫХ ШТАММОВ *B. CEREUS* В ОТНОШЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ СПОРООБРАЗУЮЩИХ АЭРОБНЫХ ПАЛОЧЕК И В ЧАСТНОСТИ В ОТНОШЕНИИ *B. ANTHRACIS*, *B. CEREUS* И *B. MYCOIDES*

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Почвы, в особенности к которым недавно были добавлены органические удобрения, почти постоянно содержат в теплые месяцы фаги, являющиеся активными в отношении *B. cereus*, *B. anthracis* и *B. mycoides*. Активность различных фаговых штаммов в отношении штаммов этих трех видов палочек варьирует в широких пределах. Только один штамм (E) оказался активным в отношении всех исследованных 156 штаммов *B. anthracis*, но этот штамм лизировал также и 16 из 73 исследованных штаммов *B. cereus*.

2. Эти фаги размножаются в почве на штаммах *B. cereus*, что доказывается убиквитарными признаками этой палочки — что не относится к *B. anthracis*, а также и наличием в почве некоторых лизогенных штаммов *B. cereus*.

3. Авторы, на основании вышеизложенных мотивов, предлагают для этого фага название «*cereus*».

4. То обстоятельство, что фаг «*cereus*» является активным как в отношении *B. cereus*, так и в отношении *B. anthracis* и *B. mycoides*, а также и то, что путем пассажей на *B. cereus* или же *B. anthracis*, не может быть получен моновалентный фаг, доказывает, что между этими тремя видами, как показали также Смитт и сотр. (1946) - существуют тесные филогенетические связи. Авторы полагают однако, что в силу соображений практического характера, следует отказаться от объединения этих трех видов в один вид.

5. Штаммы *B. anthracis* и *B. cereus* лизируются и размножают фаг, в то время как штаммы *B. mycoides* его не размножают, несмотря на их лизирование. Культуры

B. mycoides выделенные из лизированных фагом *cereus* на агаре участков, приобретают культуральные признаки вида *B. cereus*, от которого они отличаются тем, что не размножают лизирующий их фаг и, следовательно, они ведут себя также как исходные штаммы.

6. Некоторые фаги *cereus*, как это показали различные исследователи (Мак-Клой — 1951; Зейдель — 1957, Чукэ и сотр. — 1959) обладают значительной степенью специфичности и могут быть использованы для быстрой идентификации штаммов *B. anthracis*. Тест с использованием фага рекомендуется, однако, применять в сочетании с исследованием изменчивости по возможности других признаков, так как некоторые штаммы *B. cereus* также могут быть чувствительными.

DIE WIRKSAMKEIT GEWISSER AUS DEM ERDBODEN UND AUS LYSOGENEN STÄMMEN VON *B. CEREUS* ISOLIERTEN PHAGEN GEGENÜBER VERSCHIEDEN SPORENBILDENDEN AEROBEN BAZILLEN UND INSBESONDERE GEGENÜBER *B. CEREUS*, *B. ANTHRACIS* UND *B. MYCOIDES*.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Während der warmen Monate enthalten Erdböden, insbesondere solche, denen vor kurzem organische Düngemittel beigefügt wurden, fast regelmässig gegenüber *B. cereus*, *B. anthracis* und *B. mycoides* wirksame Phagen. Die Wirksamkeit dieser Phagenstämme gegenüber den Stämmen der drei angegebenen Bakterienarten schwankt in weiten Grenzen. Ein einziger Stamm (E) war allen 156 untersuchten Stämmen von *B. anthracis* gegenüber wirksam, löste aber auch 16 der 73 geprüften Stämme von *B. cereus*.

2. Im Erdboden vermehren sich diese Phagen in *B. cereus*-Stämmen, was sowohl aus der universalen Verbreitung dieser Bazillenart (was auf *B. anthracis* nicht zutrifft) als auch aus der Existenz lysogener Stämme von *B. cereus* im Erdboden hervorgeht.

3. Aus den angegebenen Gründen schlagen wir für diese Phagen die Bezeichnung « Cereus-Phagen » vor.

4. Die Tatsache, dass Cereus-Phagen sowohl gegenüber *B. cereus* als auch gegenüber *B. anthracis* und *B. mycoides* wirksam sind und dass durch wiederholte Passagen durch *B. cereus* oder *B. anthracis* keine univalenten Phagen erhalten werden können, weist darauf hin, dass zwischen den drei Arten enge philogenetische Beziehungen bestehen, was auch von Smith u. Mitarb. (1946) behauptet wurde. Unseres Erachtens widersetzen sich jedoch Überlegungen praktischer Art einer Verschmelzug dieser drei Arten in eine einzige.

5. Stämme von *B. anthracis* und *B. cereus* werden von den Phagen aufgelöst, die sich in ihnen auch vermehren, während in Stämmen von *B. mycoides* keine Vermehrung stattfindet, obwohl Auflösung eintritt. Kulturen, von *B. mycoides* die unter diesen Umständen aus den durch Cereus- Phagen auf Agar erzeugten Lysegebieten isoliert werden, erwerben die kulturellen Eigenschaften der Art *B. cereus*, von der sie sich jedoch dadurch unterscheiden, dass keine Vermehrung der sie auflösenden Phagen in ihnen stattfindet, d.h. dass sie sich wie der Ausgangsstam verhalten.

6. Wie verschiedene Forscher gezeigt haben (Mc. Cloy, 1951; Seidel, 1957; Ciucă u. Mitarb., 1959), weisen einige Cereus-Phagen einen ausgeprägten Grad von Spezifizität auf und können zur Schnelldiagnose von *B. anthracis*-Stämmen verwendet werden. Es ist jedoch empfehlenswert Phagenteste mit einer Untersuchung auf Beweglichkeit und auf andere Eigenschaften zu verbinden, da auch einige Stämme von *B. cereus* empfindlich sein können.

THE ACTIVITY OF SOME PHAGES ISOLATED FROM THE SOIL OR FROM LYSOGENIC STRAINS OF *B. CEREUS* ON VARIOUS STRAINS OF SPORING AEROBIC BACILLI AND ON *B. ANTHRACIS*, *B. CEREUS*, AND *B. MYCOIDES* IN PARTICULAR

SUMMARY

1. During the warm season, soils and more particulary those to which organic fertilizers have recently been added, almost constantly contain phages which are active on *B. cereus*, *B. anthracis*, and *B. mycoides*. The activity of various phage strains on the strains of the three

bacterial species varies within wide limits. A single strain (E) was found to be active on all the 156 *B. anthracis* strains tested, but also to lyse 16 of the 73 *B. cereus* strains investigated.

2. In the soil, these phages multiply in *B. cereus strains*, a fact resulting from the ubiquitous character of this species (in contradistinction to *B. anthracis)* as well as from the presence in the soil of lysogenic *B. cereus* strains.

3. For these reasons, the authors suggest that this phage be termed "cereus phage".

4. The fact that cereus page is active on *B. anthracis* and on *B. mycoides* as well as on *B. cereus*, and that no univalent phage can be obtained by repeated passages on *B. cereus* or *B. anthracis*, shows a close philogenetic relationship to exist between these three species (as already pointed out by Smith et al., 1946). However, the inclusion af all three species in a single one is considered to be unadvisable for practical reasons.

5. Strains of *B. anthracis* and *B. cereus* are lysed by the phage which multiplies in them, whereas no multiplication takes place in strains of *B. mycoides*, although lysis will occur. In the latter case, *B. mycoides* cultures isolated from lysed areas produced on agar by the cereus phage, acquire the cultural characters of *B. cereus*, from which they differ, however, by not permitting multiplication of the phage which lyses them, i.e. by behaving like the original strain.

6. As shown by various investigators (Mc Cloy, 1951; Seidel, 1959; Ciuca et al., 1959), some cereus phages display a marked degree of specificity and may be used for the rapid diagnosis of *B. anthracis* strains. However, it is advisable to associate phage tests with an examination for mobility and with other tests, since some strains of *B. cereus* may be susceptible as well.

ÉTUDE SUR L'APPLICATION DU TEST DE PATHOGÉNITÉ DE SERÉNY DANS L'ISOLEMENT DES *SHIGELLA*

par

M. Balş et M. Leonesco

(Travail de l'Hôpital de Maladies Contagieuses No. 1 Colentina avec la collaboration du Service des Entérobactériacées (dr. Gh. Istrati) de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino »)

—Manuscrit reçu le 31 janvier 1961 —

Le procédé d'infection conjonctivale des cobayes, préconisé par Serény (1) a été récemment appliqué par Rédey et Csizmazia (2) à l'isolement des souches pathogènes des malades de dysenterie ou entérocolite. A l'aide de cette méthode ces auteurs ont réussi à mettre en évidence des souches de *Shigella* et d'*Escherichia* qui n'avaient pu être isolées par la méthode usuelle d'ensemencement des épreuves fécales sur les milieux sélectifs; à la suite des expériences, Rédey et Csizmazia affirment que la méthode « *cobaye* » « avec sa technique actuelle, paraît être plus sensible que toutes les autres méthodes connues » pour l'isolement des souches entéro-pathogènes et bien entendu kérato-conjonctivito-positives. La grande sensibilité de la conjonctive des cobayes pour de telles souches, ainsi que la relation établie entre le caractère de pathogénité chez l'homme et celui de pathogénité pour la muqueuse conjonctivale du cobaye (2, 3) rendent cette affirmation plausible, même si pour le moment elle ne s'appuie que sur des observations expérimentales insuffisantes.

Le but de notre travail a été de vérifier la supériorité du procédé Serény, par rapport au procédé d'isolement considéré jusqu'à présent comme la méthode la plus efficiente, et d'établir certaines conditions dans lesquelles ce test peut donner de meilleurs résultats.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. *Prélèvement des échantillons de fèces.* La majorité des échantillons ont été prélevés des selles émises spontanément. Chez 26 enfants la récolte a été effectuée par sonde Nelaton, introduite dans l'ampoule rectale (5—8 cm). Après un léger siphonage, le produit arrivé dans la sonde était exprimé dans une éprouvette contenant 2—3 ml solution saline 0,85%. Dans quelques cas, le prélèvement a été fait à l'aide d'un tampon introduit par le tube du rectosigmoïdoscope jusqu'au niveau de l'ampoule rectale.

2. *Milieux d'ensemencement.* L'ensemencement des échantillons de matières fécales et l'isolement des colonies a été effectué selon la méthode usuelle du laboratoire de bactériologie de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino », affecté à l'hôpital de Maladies Contagieuses No. 1 (Chef du laboratoire Dr. V. Rusu). Confor-

mément au standards usuels pour l'isolement des *Shigella* et des *Salmonella* on a utilisé le milieu à bile sèche Istrati-Meitert ou un milieu de type Leifson avec sels biliaires et respectivement Wilson-Blair et le milieu Istrati-Meitert après un préalable enrichissement avec du sélénite.

Pour isoler les souches pathogènes par le procédé du passage sur la conjonctive du cobaye, on a employé comme milieu « intermédiaire » pour l'ensemencement des échantillons de fèces, le milieu à bile sèche en couche oblique (tubes 18/180) et, dans un nombre réduit de cas, de la gélose nutritive avec 5% sang défibriné de mouton également en couches obliques. On a employé des milieux à bile sèche, fraîchement préparés (tout au plus 72 heures).

3. *Sérums agglutinants pour le diagnostic.* On a utilisé les sérums suivants livrés par l'Institut « Dr. I. Cantacuzino »: sérum polyvalent anti-flexner, anti-boyd, anti-Q, anti-salmonella, ainsi que des sérums monovalents anti-shiga, anti-schmitz, anti-sonne « S » et anti-sonne « R »; sérums absorbés monospécifiques de type et de groupe pour les *Shigella* du sousgroupe B; anti-O et anti-flagellaires pour les *Salmonella.*

4. *Cobayes.* Pour l'infection de la conjonctive on a utilisé des cobayes de 150—300 g, normaux ou utilisés antérieurement au titrage des sérums antidiphtérique, anti-tétanique ou anti-gangréneux. Pour chaque échantillon de selle on a utilisé un seul cobaye. Les animaux infectés étaient maintenus en bocaux séparés, afin d'éviter la contagion réciproque.

5. *Procédé d'isolement des souches pathogènes par passage intermédiaire sur oeil de cobaye.* Les échantillons prélevés sont immédiatement ensemencés à l'aide d'une anse, sans dilution préalable, dans les tubes avec milieu sélectif, en couche oblique ou avec gélose sang (milieux « intermédiaires »). Après incubation d'environ 20 heures à 37°, la culture se développe, le plus souvent sous forme de pélicule continue de couleur jaune sur le milieu sélectif (indicateur — bleu de bromthyol). A l'exception de quelques cas, où se sont développées des colonies isolées qui n'ont pas viré la couleur du milieu et étaient aptes à être directement soumises aux examens de typage sérologique, la culture — habituellement mixte — n'a pu être étudiée sans dispersion préalable. Des cultures développées, on prélevait à ce moment par deux anses pleines (○ 3 mm), en les déposant au fond des sacs de la conjonctive de l'œil d'un cobaye. La même quantité de culture était déposée sur la conjonctive de l'œil opposé. Les jours suivants, on récoltait les produit des yeux de chaque cobaye, à l'aide d'une anse, en l'ensemençant sur milieu sélectif. Si entre temps on n'isolait pas de germes pathogènes, les oculo-cultures étaient répétées au moins 5 jours de suite. Les cobayes étaient observés pendant minimum 10 jours. Les phénomènes inflammatoires et l'évolution de la kérato-conjonctivite ont été décrits dans une communication antérieure (4).

6. *Provenance des échantillons de fèces.* En vue du diagnostic on a étudié par les deux méthodes — classique et méthode « cobaye » — 106 échantillons de selles, comme suit:

88 provenant de malades avec diagnostic clinique de dysenterie aiguë
5 provenant de malades avec diagnostic clinique d'entérocolite aiguë
4 provenant de malades avec diagnostic clinique de toxiinfections alimentaires
4 provenant de malades avec diagnostic clinique de dysenterie chronique
2 provenant de malades avec diagnostic clinique de colite chronique
1 provenant de malades avec polypes intestinaux
2 provenant de porteurs de bacilles dysentériques.

En plus, on a étudié 40 échantillons de matières fécales provenant d'un lot formé par:

30 malades de scarlatine
5 malades de parotidite épidémique
2 malades d'angine pultacée
1 malades d'érysipèle bulleux du visage
1 malades de broncho-pneumonie
1 malades d'ictère mécanique.

RÉSULTATS

1. *Efficacité comparative des milieux « intermédiaires »*. Chacun des premiers 25 échantillons ont été simultanément ensemencés sur les deux milieux « intermédiaires »: gélose sang et gélose bile. La culture développée sur gélose-sang a servi à infecter un œil du cobaye et celle sur gélose-bile à infecter l'œil opposé du même animal. Les résultats comparatifs obtenus sur 9 épreuves positives des 25 échantillons examinés sont enregistrés dans le tableau I.

Tableau I

Positivation de l'oculo-culture et début de la kérato-conjonctivite chez les cobayes infectés avec des cultures développées sur milieu « intermédiaire » gélose-sang et chez les cobayes infectés avec des cultures développées sur milieu « intermédiaire » gélose-bile.

Oculo-cultures positives après:		Nombre échantillons ayant déterminé le début de la maladie après:				Total échantillons positifs
		1 jour	2 jours	3 jours	5 jours	
1 jour	gélose-sang	3	1	0	0	4
	gélose-bile	5	1	0	0	6
2 jours	gélose-sang	0	1	0	0	1
	gélose-bile	0	1	1	0	2
5 jours	gélose-sang	0	0	0	0	0
	gélose-bile	0	0	0	1	1

On constate du tableau I que le nombre des isolements a été presque double (9 par rapport à 5) par l'emploi du milieu « intermédiaire » gélose-bile. Ce fait, ainsi que les intervalles généralement moins longs entre l'infection et la positivation des oculo-cultures, ainsi que le début de la maladie, plaident en faveur du milieu gélose-bile, raison pour laquelle dans la suite de nos recherches nous avons utilisé exclusivement la gélose-bile. La culture développée sur ce milieu a été déposée sur les conjonctives d'un même cobaye.

2. *Efficacité de la méthode « cobaye » en comparaison avec la méthode classique d'isolement*. Les résultats obtenus sur 106 échantillons de selles sont synthétisés dans le tableau II.

Tableau II

Efficacité comparative entre la méthode « cobaye » et la méthode classique d'isolement, contrôlée sur 106 échantillons de selles

Isolées par:	Souches								
	Flexner	Sonne	Schmitz	Boyd	Total Shigella	Salm. para C.	Salm. typhi murium	Total Salmonella	Total Salm. + Shig.
les deux méthodes	16	1	0	0	17	1	1	2	19
seulement par méthode « cobaye »	21	3	1	1	26	0	1	1	27
seulement sur milieu sélectif	4	2	0	0	6	0	4	4	10
Total isolements par méthode « cobaye »	37	4	1	1	43(40,1%)	1	2	3(2,8%)	46(42,9%)
Total isolements sur milieu sélectif	20	3	0	0	23(21,7%)	1	5	6(5,6%)	29(27,1%)
Total isolements « cobaye » + milieu sélectif	41	6	1	1	49(46,2%)	1	6	7(7,6%)	56(52,9%)

Du tableau II il ressort de manière évidente, la supériorité de la méthode « cobaye » par laquelle on a isolé deux fois plus de *Shigella* que par la méthode du milieu sélectif (40,1% par rapport à 21,7%) *. Dans la grande majorité des cas, les oculo-cultures sont devenues positives le deuxième jour après l'infection des yeux; les premières manifestations inflammatoires sont apparues de même, dans la plupart des cas, après le même intervalle de temps. Les données concernant ces intervalles sont synthétisées dans le tableau III.

Tableau III

Intervalle de temps écoulé depuis l'infection conjonctivale jusqu'à la positivation des oculo-cultures et l'apparition des premières manifestations inflammatoires

des oculo-cultures positives après:	Nombre des échantillons qui ont déterminé le début de la maladie après:					Echantillons qui n'ont pas déterminé de maladie	Total oculo-cultures positives
	1 jour	2 jours	3 jours	5 jours	10 jours		
1 jour	30 *	5	3	0	1	1	40
2 jours	0	2	1	0	1	0	4
3 jours	0	1	0	0	0	0	1
5 jours	0	0	0	1	0	0	1

* 3 echantillons contenaient des Salmonella.

* Le pourcentage des *Shigella* isolées dans le même laboratoire pendant l'année 1959 a été de 25,4% pour les adultes et de 43,3% pour les enfants.

Des 46 échantillons qui ont donné des oculo-cultures positives, 40 sont devenus positifs un jour après l'infection oculaire, 4 après 2 jours, un après 3 jours et le dernier après 5 jours. Il va de soi qu'une fois l'oculo-culture devenue positive, la déclaration immédiate ou tardive de la maladie ne présente plus d'importance. Selon nos expériences, si la maladie ne s'est pas déclarée les premiers 5 jours, elle peut débuter le 9-e ou 10-e jour de l'infection; son apparition après cet intervalle n'est qu'exceptionnelle. Etant donné que pour le diagnostic la pratique de l'oculo-culture est essentielle et qu'elle devient habituellement positive dans les premières 24 heures, avant les manifestations inflammatoires, son utilisation 24 heures après l'infection des yeux devient obligatoire, indifféremment de l'apparition ou la non-apparition des symptômes pathologiques oculaires.

Bien que le nombre des échantillons étudiés soit relativement réduit, on peut toutefois constater que la méthode « cobaye » ne favorise pas l'isolement de certaines espèces de *Shigella* ou de certains types sérologiques au détriment d'autres espèces et souches. Les 43 souches de *Shigella* isolées par cette méthode, sont réparties comme suit: *Sh. dysenteriae* type 2 — une souche, *Sh. boydi* — une souche (le type de cette souche n'a pas encore été déterminé), *Sh. sonnei* — 4 souches et *Sh. flexneri*— 37 souches. De ces dernières, deux étaient de type 1a, une de type 1b, 21 de type 2a, deux de type 2b, 9 de type 3_2, une de type 6 et une variante X. Cette répartition correspond entièrement à la structure de l'incidence des *Shigella* en Roumanie. Ainsi qu'on peut le constater, la liste des souches isolées comprend presque toutes les espèces de *Shigella* et presque tous les types de *Shigella flexneri* figurant dans le tableau de classification de ce groupe de germes. De même on n'a pas observé que certaines espèces et types soient capables de déterminer plus rapidement que d'autres espèces et types une positivation de l'oculo-culture ni un début de la maladie plus précoce. En effet, le début de la maladie et par conséquent la positivation des oculo-cultures sont en fonction du pouvoir pathogène de la souche, de la réaction de l'animal et, bien entendu, du nombre de germes introduits lors de l'infection, ne dépendant pas de leurs particularités antigéniques.

En ce qui concerne l'isolement des *Salmonella*, ainsi qu'il ressort des données exposées, la méthode « cobaye » s'est avérée inférieure à la méthode classique. Ces résultats ont été prévus par nous, étant donné que ce groupe de germes, le plus souvent, ne déterminent au niveau des yeux des cobayes que de légers phénomènes inflammatoires (pour la plupart du temps, une légère sécrétion de courte durée) ou bien laissent l'œil totalement indemne. Il faut remarquer qu'une partie des *Salmonella*, isolées seulement sur milieux sélectifs, accompagnaient une *Shigella*, que nous avons isolée soit par les deux méthodes, soit seulement sur cobayes. Tenant compte de la sensibilité de l'œil du cobaye pour les *Shigella*, il est possible que leur association avec les *Salmonella*, empêche le développement de ces dernières, rendant pratiquement impossible leur mise en évidence par les oculo-cultures ultérieures. Néanmoins, l'étude d'un nombre de 80 échantillons de selles, nous a permis d'isoler par la méthode « cobaye », toutes les *Salmonella* isolées sur milieux sélectifs et même d'identifier une en plus. Ces résultats pourraient justifier l'espoir fondé sur l'utilité éventuelle de la méthode « cobaye » dans l'isolement des *Samonella*.

3. *Données fournies par le lot de sujets atteints d'autres maladies que celles de nature entéro-colitique.* La méthode « cobaye » a été aussi appliquée, par comparaison à la méthode usuelle, à l'examen des 40 échantillons de fèces provenant de sujets atteints d'autres infections que des infections digestives (voir « Matériel et méthodes »). Chez 4 de ces malades, on a isolé par la méthode

« cobaye » les souches pathogènes suivantes: une souche de *S. enteritidis Gärtner* chez un malade de scarlatine; une souche de *Sh. flexneri* 3_2 chez deux autres malades de scarlatine; une souche de *Sh. flexneri* type IV chez un malade de parotidite épidémique. Chez ce dernier, on a mis en évidence, en plus, une souche de *E. coli*, dont le type sérologique n'a pas encore été identifié et qui provoque chez le cobaye une kérato-conjonctivite pareille à celle déterminée par les *Shigella*. Ce malade est le seul de ce lot dont on a isolé la souche de *Sh. flexneri* aussi par la méthode classique.

Bien que le nombre de cas étudiés soit réduit, on peut néanmoins affirmer que la méthode « cobaye » s'est avérée une fois de plus supérieure à la méthode classique. Il est utile de mentionner qu'aucun des malades du lot étudié, pas même ceux dont on a isolé des souches pathogènes, n'ont présenté ni au cours des recherches, ni dans leurs antécédents, des troubles du transit intestinal. Chez 8 de ces malades qui ont été soumis à une recto-sygmoïdoscopie, la muqueuse intestinale était d'aspect normal dans la portion accesible à l'examen.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La méthode unanimement reconnue aujourd'hui comme étant la meilleure pour l'isolement des germes du groupe *Shigella*, des malades avec différentes formes de dysenterie, est la méthode des coprocultures effectuées sur milieux de type Leifson, tel le milieu Istrati-Meitert, utilisé dans nos laboratoires. Malgré son incontestable valeur, il existe de nombreuses indications qui justifient l'opinion selon laquelle l'emploi de cette méthode, même dans des conditions techniques optimes, laisse encore un nombre important de cas de dysenterie dus aux *Shigella* non-décelés bactériologiquement.

Ce fait est dû, en premier lieu, à la nécessité d'une plus grande dilution des échantillons des fèces avant l'ensemencement, afin d'obtenir des colonies isolées, facilement visibles dans la masse des colonies qui vire l'indicateur, habituellement des colonies de *E. coli*, qui le plus souvent se développent en dépit de l'action inhibitrice du milieu.

Selon les recherches de Thomson (5), dans les cas de dysenterie dus à la *Sh. sonnei*, pour obtenir sur 1 ml une concentration de 5—50 germes, il est nécessaire d'effectuer une dilution des fèces de 1: 1.000.000. Par conséquent, cette dilution représente la condition la plus favorable pour obtenir des colonies isolées, vu que le nombre de 5—50 colonies de germes pathogènes permet aisément leur identification, en tenant compte du fait que le nombre de colonies exigées pour le diagnostic de l'*E. coli* est plusieurs fois plus élevé que le nombre des colonies de *Shigella*. Pourtant, si l'on a en vue la sélectivité des milieux de culture utilisés, on effectue des dilutions dix fois ou même 100 fois moins grandes, les dilutions correspondantes de 1: 100.000 ou de 1: 10.000 sont encore suffisamment élevées pour que de nombreux échantillons de fèces contenant très peu de germes pathogènes, répondent négativement à la recherche bactériologique par coprocultures. Dans cette étape du diagnostic bactériologique des dysenteries bacillaires, dans laquelle la limite critique atteinte par la méthode des coprocultures ne pourra être dépassée que par l'élaboration de milieux d'enrichissement efficaces ou de milieux à grande sélectivité, la méthode expérimentée par nous, présente d'importants avantages, dus à la haute sélectivité de la conjonctive

et de la cornée du cobaye vis-à-vis de l'infection avec des *Shigella* et à la résistance de ces muqueuses aux infections avec d'autres entérobactéries. Les titrages effectués nous ont permis de constater que le pouvoir infectant pour certains cobayes commence à se manifester à partir de 10.000 germes (peut-être même moins) et qu'à 1.000.000 germes (d'habitude encore moins) les cobayes ne sont pratiquement plus résistants. Ces limites varient, sans doute, d'une souche à l'autre, mais il est plus que probable que les souches récemment isolées soient pour le moins tout aussi virulentes que la souche de laboratoire titrée par nous. Il nous est donc permis d'affirmer qu'une seule colonie de germes est capable de déterminer la kérato-conjonctivite chez le cobaye, vu qu'une colonie de dimensions moyennes contient beaucoup plus que 1.000.000 germes viables.

Sans nous baser sur un titrage précis, nous avons maintes fois vérifié que le pouvoir pathogène des *Shigella* se manifeste, même si elles sont déposées sur la conjonctive du cobaye en association avec un nombre beaucoup plus élevé de germes d'une autre espèce, respectivement d'*E. coli*. Ce pouvoir sélectif de l'œil du cobaye se reflète dans les oculo-cultures successives faites les premiers jours consécutifs à l'ensemencement, oculo-cultures qui mettent en évidence d'une part, la disparition totale des germes *Coli* dès le lendemain et d'autre part, la croissance sensible des germes de *Shigella*.

Ces deux facteurs — sensibilité et sélectivité — permettent en premier lieu l'ensemencement direct de l'échantillon de fèces non-dilué sur un milieu intermédiaire — de préférence un milieu sélectif — et en second lieu, une infection massive de l'œil du cobaye avec la flore totale développée pendant 18—20 heures sur ce milieu.

Les résultats obtenus par nous ont vérifié dans leur totalité les aspects positifs de ces deux facteurs dans l'isolement des *Shigella*, à l'aide de la méthode « cobaye », selon la technique indiquée.

Néanmoins, bien que la méthode soit d'une grande simplicité, par cela même à la portée de tout technicien, elle ne peut encore — dans les conditions actuelles - être admise sur large échelle dans la routine de laboratoire, vu que:

1. par rapport à la méthode usuelle, elle retarde au moins d'un jour le résultat bactériologique;

2. elle surcharge la routine de laboratoire, par le procédé d'infection, ainsi que par la nécessité d'effectuer des oculo-cultures quotidiennes au moins 5 jours de suite, créant implicitement des dépenses supplémentaires en milieux de culture et boîtes Petri;

3. la manipulation d'un nombre plus grand de cobayes que le minimum nécessaire n'est pas à la portée de n'importe quel laboratoire, même si une grande partie des cobayes peuvent être utilisés à nouveau (il s'agit d'animaux qui ne font pas la maladie ou qui peuvent être employés une seconde fois un certain temps après leur guérison — au moins 30 jours);

4. la méthode impose des conditions spéciales d'isolement des cobayes, qui pourraient constituer — surtout pendant l'été — une source d'infection humaine.

Une partie de ces désavantages pourrait être évitée à l'avenir, à condition de trouver la modalité d'augmenter la sensibilité des cobayes afin de permettre l'infection directe de l'œil avec des matières fécales et d'éviter ainsi l'emploi de milieux intermédiaires, de trouver la possibilité d'utiliser les cobayes destinés

à la production de l'alexine sans influencer le titre alexique et, enfin, en créant dans les laboratoire de routine des conditions spéciales qui permettent l'entretien d'un nombre suffisant de cobayes.

Pour l'instant, la méthode « cobaye » peut, et même doit être utilisée chaque fois que la méthode classique d'isolement des *Shigella* n'a pas donné une solution bactériologique aux cas d'entérocolites rebelles. Elle s'impose également dans n'importe quelles recherches qui prévoient, parmi les autres tests, l'isolement des produits pathologiques de *Shigella*. Sans doute, elle peut présenter une réelle utilité dans le dépistage des porteurs sains ou inapparents.

RÉSUMÉ

1. On présente les résultats obtenus par une nouvelle méthode d'isolement des *Shigella* et autres entérobactéries pathogènes des échantillons de matières fécales. La méthode préconise comme étapes intermédiaires l'ensemencement des matières fécales, non diluées, sur milieu sélectif à bile sèche Istrati-Meitert et l'infection consécutive de la conjonctive du cobaye (test Serény) avec la culture totale développée sur ce milieu pendant 18—20 heures d'incubation.

2. Par cette méthode on a isolé, de 106 échantillons de matières fécales, deux fois plus de *Shigella* (40,1%), que par la méthode usuelle des coprocultures sur milieux sélectifs (21,7%).

3. La méthode permet également — bien que dans certaines limites — l'isolement des *Salmonella* des malades avec des affections dysentériformes.

4. La méthode offre la possibilité d'isoler aussi d'autres entérobactéries pathogènes, capables de déterminer chez le cobaye la kérato-conjonctivite.

5. Malgré tous les avantages présentés par cette méthode, dus à la sensibilité et à la sélectivité des muqueuses conjonctivales et cornéennes des cobayes vis-à-vis des souches de *Shigella*, elle présente une série de désavantages qui limitent son application, dans les divers laboratoires du terrain seulement à certains cas.

BIBLIOGRAPHIE

1. Serény B. — Acta Microbiol. Acad. Sc. Hung., 1955, **2**, 293.
2. Rédey B. et Csizmazia F. — Acta Microbiol. Acad. Sc. Hung., 1960, **7**, 11.
3. Istrati Gh. — Arch. Roum. de Pathol. expér. et de Microbiologie, 1961, **20**, 53
4. Gorea A. et Maldăresco I. — Arch. Roum de Path. Expér. et de Microbiologie, 1959, **18**, 245.
5. Thomson J. — J. Hyg., 1955, **53**, 217.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ВОПРОСУ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТА ПАТОГЕННОСТИ «СЕРЕНИ» ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ *SHIGELLA*

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В работе излагаются результаты, полученные при использовании нового метода для выделения *Shigella* и других патогенных энтеробактерий из проб фекальных масс. В качестве промежуточных этапов, при этом методе пользуются засевом неразведенных фекальных масс на селективную питательную среду, с применением высушенной желчи по методу Истрати-Мейтерта, с последующим заражением конъюнктивы

морской свинки — тест Шереши — общей культурой развившейся на этой питательной среде после 18—20 часов инкубации.

При помощи этого метода удалось выделить из 106 проб фекальных масс в два раза большее число *Shigella* (40,1%) по сравнению с обычным методом копрокультур на селективных средах (21,7%).

В некоторых пределах этот метод позволяет выделить штаммы *Salmonella* у больных с дизентериформными заболеваниями.

Метод позволяет также выделение других патогенных энтеробактерий, которые в состоянии вызвать у морских свинок кератоконъюнктивит.

Несмотря на все обусловленные чувствительностью и селективностью слизистой оболочки конъюнктивы и роговицы морских свинок в отношении *Shigella* преимущества этого метода, он все же представляет некоторые недостатки, ограничивающие его применение в лабораториях на местах только в определенных случаях.

UNTERSUCHUNG ÜBER DIE ANWENDBARKEIT DES PATHOGENITÄTSTESTS NACH SERÉNY BEI DER ISOLIERUNG VON *SHIGELLA*

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird über die mit Hilfe eines neuen Verfahrens zur Isolierung von Shigellen und anderen pathogenen Enterokokken aus Stuhlproben erzielten Ergebnisse berichtet. Bei diesem Verfahren werden die unverdünnten Faeces in einer Zwischenstufe auf Istrati-Meiterts selektivem Trockengallenährboden verimpft und die ganze, nach 18—20 Stunden Bebrütung entwickelte Kultur, anschliessend zur Infektion der Bindehaut beim Meerschweinchen (SERÉNYS Test) verwendet.

Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten *Shigellen* aus 106 Stuhlproben zweimal öfter isoliert werden (40,1%) als durch das gewöhnliche Verfahren der Stuhlkulturen auf selektiven Nährböden (21,7%).

In gewissen Grenzen gestattet das Verfahren die Isolierung von *Salmonellen* bei Patienten, die an dysenterieähnlichen Erkrankungen leiden.

Das Verfahren ermöglicht weiterhin auch die Isolierung anderer pathogener Enterobakterien, die beim Meerschweinchen eine Keratokonjunktivitis hervorrufen können.

Trotz aller Vorteile dieses Verfahrens, die auf die Empfindlichkeit und Selektivität der Bindehaut und Hornhaut des Meerschweinchens für Shigellenstämme zurückzuführen sind, hat es doch auch eine Reihe von Nachteilen, die seine Anwendbarkeit in den üblichen Laboratorien auf gewisse Fälle einschränken.

A STUDY CONCERNING THE APPLICATION OF SERÉNY'S PATHOGENICITY TEST TO THE ISOLATION OF *SHIGELLAE*

SUMMARY

The results obtained by means of a new method for the isolation of *Shigellae* and of other pathogenic enterobacteria from stool specimens, are reported in this paper. The method includes an intermediary step consisting in the inoculation of undiluted faeces on Istrati-Meitert's dry bile medium, followed by infection of the conjunctiva in guinea-pigs (SERÉNY'S test) with the whole culture that has developed on this medium at the end of 18—20 hours of incubation.

By means of this method, from 106 stool specimens *Shigellae* could be isolated twice as often (40. 1 per cent) than by the current method of coprocultures on selective media (21.7 per cent).

Within certain limits, the method allows of *Salmonella* strains to be isolated from patients displaying dysenteriform syndromes.

The method likewise permits the isolation of other pathogenic enterobacteria which are apt to cause keratoconjunctivitis in the guinea-pig.

In spite of its advantages resulting from the selective suceptibility to *Shigella* strains of the conjunctival mucosa and the cornea in the guinea-pig, this method displays various disadvantages which restrict its applicability in field laboratories to certain definite cases.

SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES DES GERMES DU GROUPE *PROTEUS*, ISOLÉS CHEZ L'HOMME ET LE RAPPORT AVEC LEUR STRUCTURE ANTIGÉNIQUE

par

N. Nestoresco,
Marcella Popovici
D. Floresco,
Elisabeta Bădulesco
*(Institut « Dr. I. Cantacuzino »
Service des Entérobactériacées)*

D. C. Racoviță
Emilia Thomas
*(Clinique Chirurgicale I
Hôpital Panduri)*

— Manuscrit reçu le 29 novembre 1960 —

L'incidence accrue des infections urinaires due aux germes du groupe *Proteus* est de plus en plus signalée, comme une conséquence de l'utilisation sur large échelle des antibiotiques.

Cette augmentation reconnaîtrait comme mécanisme une substitution de la flore autrefois incriminée dans ces affections, par les germes de ce groupe d'Entérobactériacées, ainsi qu'une sélection probable des souches de *Proteus* résistantes aux antibiotiques, qui pourraient constituer le « type d'hôpital ».

La sélection des germes du groupe *Proteus*, à la suite de l'antibiothérapie, pourrait être exemplifiée, entre autres, par l'étude de Koch (1960) (2), qui a constaté l'augmentation progressive, d'une année à l'autre, de la proportion des souches résistantes au chloramphénicol parmi les souches de *Proteus*, allant de 22% en 1953 à 47% en 1958.

Les études concernant les relations entre la présence dans l'urine de ces germes et le mécanisme des infections du tractus urinaire sont encore limitées, étant donné que l'emploi des méthodes scientifiques épidémiologiques (différenciation sur base sérologique ou selon la sensibilité aux bactériophages) est pratiquement absente dans ce domaine.

En ce qui concerne la sensibilité aux substances antibiotiques des germes du groupe *Proteus*, différenciés uniquement par critérium biochimique, il existe plusieurs recherches, entre autres celles de Suter et Ulrich (1959) (3), qui ont montré que les souches appartenant aux sous-groupes biochimiques de *Proteus vulgaris* et *Proteus mirabilis* sont procentuellement plus résistantes aux antibiotiques que les souches de *Proteus morgani* et *rettgeri*.

Etant donné que la sensibilité des germes aux antibiotiques est un attribut de souche et qu'une étude analytique des sous-groupes biochimiques de *Proteus* peut s'effectuer à l'aide de déterminations sérologiques, nous nous sommes proposé d'étudier:

1. s'il existe une relation entre la structure antigénique des souches isolées d'infections urinaires et leur sensibilité aux antibiotiques;

2. s'il existe une sélection des souches provenant d'infections urinaires dans le processus épidémique de ces dernières, sélection comparable à la distribution naturelle des *Proteus* dans le milieu extérieur, surtout dans les eaux polluées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a étudié 152 souches de *Proteus* isolées d'infections urinaires provenant d'un même milieu d'hôpital, comparativement à 100 souches isolées d'eaux polluées *).

Pour la détermination sérologique des souches de *Proteus* étudiées, on a utilisé 68 sérums agglutinants *anti-Proteus* (49 anti « O » et 19 anti « H »), préparés dans notre laboratoire à l'aide de souches standard.

La détermination sérologique des souches a été effectuée selon les indications du schéma antigénique de diagnostic, recommandé par PERCH et KAUFFMANN (1).

Les identifications sérologiques pour les antigènes « O » ont été réalisées par agglutination sur lame avec des mélanges de sérums, complétées par agglutination en tube avec les sérums pris séparément, utilisant des cultures chauffées 1 heure à 100°; lecture après 24 heures d'incubation à 37°. Pour l'identification des antigènes « H » on n'a effectué que des agglutinations sur lame, utilisant des sérums adsorbés.

On a déterminé la sensibilité de toutes les souches envers les chimiothérapeutiques suivants: streptomycine, inamycine, rovamycine, soframycine, kanamycine, formycétine, néomycine, chloramphénicol, biomycine, terramycine, auréomycine, érythromycine, polymixine B, sigmamycine, colimycine, pénicilline, colifurène, sulfathiazol, furadantin, nitrofuran.

La détermination de la sensibilité des souches a été effectuée selon la méthode diffusimétrique d'ERNA LUND.

Afin de mettre en évidence les éventuelles différences du potentiel de sélection des variantes antibiotico-résistantes des populations microbiennes sensibles, entre les souches isolées des infections urinaires et celles isolées d'eaux polluées on a étudié du point de vue quantitatif et qualitatif les colonies résistantes apparues sur l'aire d'inhibition. Dans ce but, on a testé de nouveau ces colonies envers les antibiotiques respectifs, ainsi qu'envers différents mélanges de ces antibiotiques; là où il nous a été possible, nous avons compté le nombre des colonies.

RÉSULTATS

1. Les souches de *Proteus* isolées des infections urinaires, en proportion de 98% appartenaient au sous-groupe biochimique *Proteus mirabilis*.

Du point de vue sérologique, on a pu classer ces souches en proportion de 80,3% dans 18 séro-types; le reste de 19,7% n'a pu être identifié sérologiquement. Des souches déterminées sérologiquement, 81,1% appartenaient seulement à 3 séro-types, notamment: 36,3% au type O_3H_1, 32,4% au type $O_{32}H_3$ et 12,4% au type O_9H_3.

*) Nous présentons nos remerciements aux Docteurs S. Sturdza et S. Buşilă pour avoir mis à notre disposition les souches de *Proteus* isolées des eaux polluées.

Contrainement aux souches provenant des infections urinaires, les souches isolées des eaux polluées ont montré une remarquable diversité de type sérologique. Ainsi, des 100 souches de cette catégorie, 71% ont pu être identifiées sérologiquement, le reste étant non-typables.

Les souches typables appartenaient à 46 types sérologiques, sans présenter une prédominance d'un séro-type quelconque.

En ce qui concerne le comportement envers les substances chimiothérapeutiques, les souches étudiées - tant celles isolées des infections urinaires que celles isolées des eaux polluées — ont montré un pourcentage élevé de sensibilité aux antibiotiques suivants: inamycine (73,6% respectivement 66,3%), kanamycine (62,4% soit 56,4%), formycétine (57, 8% soit 41,6%) chloromycétine (57,2% soit 39,6%), soframycine (50,6% soit 67,3%) et néomycine (49,6% soit 40,6%). On a observé une grande différence chez les souches provenant d'infections urinaires et celles isolées des eaux en ce qui concerne leur comportement envers la streptomycine; tandis que les premières n'étaient sensibles qu'en proportion de 9,8% les dernières ont été sensibles en 82% des cas.

Autres cinq antibiotiques (auréomycine, terramycine, biomycine, sigmamycine et pénicilline) ont eu une activité faible pour les deux catégories de souches. La rovamycine a montré une certaine activité, mais seulement envers les souches isolées d'infections urinaires.

Quant au reste des chimiothérapeutiques utilisés (érythromycine, colimycine, polymixine B, furadantin, colifurène, sulfathiazol et nitrofuran), ils ont été complètement inactifs.

L'étude des relations entre la structure antigénique des souches isolées d'infections urinaires et leur sensibilité aux chimiothérapeutiques, prouve l'existence de différences procentuelles de sensibilité entre les souches appartenant aux trois séro-types prédominants.

Ainsi, les souches de type O_3H_1 ont été plus sensibles à l'inamycine (80%), au chloramphénicol (71,1%) et à la formycétine (68,8%); les souches du type sérologique $O_{32}H_3$ ont été plus sensibles que les autres à la néomycine, tandis que, celles de type O_9H_3 se sont montrées les plus sensibles à la kanamycine (84,6%) et à la soframycine (53,8%).

Les souches appartenant aux autres types sérologiques n'ont pas été étudiées comparativement du point de vue comportement aux antibiotiques, leur nombre étant trop réduit.

L'étude de la fréquence des mutantes résistantes dans les populations microbiennes sensibles aux différents antibiotiques employés n'a mis en évidence aucune différence significative entre les souches isolées d'infections urinaires et celles isolées d'eaux polluées.

Les mutantes résistantes étudiées par rapport aux mélanges, ont eu un comportement différent. Parfois elles demeuraient résistantes aux substances séparées des mélanges, ainsi qu'aux mélanges des antibiotiques respectifs. D'autres fois, bien que résistantes aux substances individuelles, elles étaient sensibles aux antibiotiques associés. On n'a pu établir aucune relation entre les caractéristiques sérologiques et leur sensibilité aux mélanges d'antibiotiques. Il serait plutôt question d'une caractéristique particulière propre à certains clones provenant d'un certain individu bactérien.

CONCLUSIONS

1. Les souches du groupe *Proteus*, isolées d'infections urinaires dans un milieu d'hôpital, ont appartenu en majorité à quelques sérotypes, ce qui tend a démontrer l'existence de certains « types d'hôpital ».

2. Par rapport à la sensibilité envers les chimiothérapeutiques, les souches des infections urinaires ont présenté un degré de sensibilité plus élevé à l'inamycine, la kanamycine, la formycétine, le chloramphénicol, la soframycine et la néomycine.

3. Contrairement aux souches isolées des eaux polluées, les souches isolées des infections urinaires ont montré un degré accentué de résistance à la streptomycine, ce qui pourrait être la conséquence de leur contacts répétés dans la clinique avec cet antibiotique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kauffmann F. et Perch B. — Acta Path, Scand., 1947, **24**, 135
2. Koch M. L. — Antibiotics Chem., 1960, **10**, 364
3. Suter L. S. et Ulrich E. W. — Antibiotics Chem., 1959, **9**, 38.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ВЫДЕЛЕННЫХ У ЧЕЛОВЕКА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГРУППЫ *PROTEUS* И СООТНОШЕНИЕ С ИХ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРОЙ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В статье излагаются результаты исследования 152 штаммов *Proteus*, выделенных при мочевых инфекциях в той же госпитальной среде — по сравнению с результатами исследования 100 штаммов, выделенных из загрязненных вод, в целях установления возможных соотношений между антигенной структурой и чувствительностью штаммов к антибиотикам.

Серологические определения штаммов производились согласно указаниям антигенной схемы для их определения, которую рекомендуют Перх и Кауфманн, с использованием 49 сывороток анти «О» и 19 сывороток анти «Н», приготовленных в лаборатории при помощи стандартных штаммов.

Результаты: штаммы, выделенные при мочевых инфекциях, принадлежали преимущественно к определенным серотипам (O_3H_1, $O_{32}H_3$ и O_9H_2) в противоположность выделенным из воды штаммам, которые принадлежали к различным серотипам, что может служить указанием на существование определенных «больничных» штаммов.

В связи с чувствительностью к химиотерапевтическим препаратам, выделенные при мочевых инфекциях штаммы оказались обладающими некоторой повышенной степенью чувствительности к ампицилину, канамицину, формицетину, хлорамфениколлу, софрамицину и неомицину.

В противоположность штаммам выделенным из загрязненных вод, штаммы выделенные при мочевых инфекциях обладают весьма выраженной резистентностью к стрептомицину, что может быть результатом их повторного контакта в клинике с этим антибиотиком.

EMPFINDLICHKEIT DER VON MENSCHEN ISOLIERTEN KEIME DER *PROTEUS*-GRUPPE FÜR ANTIBIOTIKA UND BEZIEHUNGEN ZU IHRER ANTIGENSTRUKTUR

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über Untersuchungen an 152 bei Infektionen des Harnapparats im gleichen Krankenhausmilieu isolierten *Proteusstämmen*, im Vergleich mit 100 aus verunreinigtem Wasser isolierten Stämmen berichtet. Zweck dieser Untersuchung war es, möglicherweise bestehende

Zusammenhänge zwischen der Antigenstruktur der Stämme und ihrer Empfindlichkeit für Antibiotika zu erfassen. Die serologische Bestimmung der Stämme wurde nach den Angaben des von PERCH und KAUFFMANN für die Antigendiagnose anempfohlenen Schemas durchgeführt, wobei 49 « O »-Antiseren und 19 « H »-Antiseren, die mit Standardstämmen im Laboratorium hergestellt wurden, zur Verwendung kamen.

Ergebnisse. Die bei Infektionen des Harnapparats isolierten Stämme gehörten vorwiegend bestimmten serologischen Typen an (O_3H_1, $O_{33}H_3$ und O_9H_3), im Gegensatz zu den aus Wasser isolierten Stämmen, die verschiedenen serologischer Typen angehörten. Dies scheint auf die Existenz bestimmter « Krankenhaustypen » hinzuweisen.

Hinsichtlich der Empfindlichkeit für Chemotherapeutika, wiesen die bei Infektionen des Harnapparats isolierten Stämme eine erhöhte Empfindlichkeit für Inamyzin, Kanamyzin, Formyzetin, Chloramphenikol, Soframyzin und Neomyzin auf.

Im Gegensatz zu den aus verunreinigtem Wasser isolierten Stämmen, wiesen die bei Infektionen des Harnapparats isolierten einen bedeutenden Grad von Widerstandsfähigkeit gegen Streptomyzin auf, was eine Folgeerscheinung ihrer wiederholten Berührung mit diesem Antibiotikum in der Klinik sein könnte.

SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS OF GERMS OF THE *PROTEUS* GROUP AS ISOLATED FROM HUMANS. RELATIONSHIP WITH THEIR ANTIGENIC STRUCTURE

SUMMARY

A study is reported of 152 *Proteus* strains isolated from cases of urinary infection in the same hospital environment, as compared to 100 strains isolated from polluted water. The possible existence of a relationship between the antigenic structure and the susceptibility to antibiotics of the strains was investigated. Serological typing of the strains was carried out according to the indications of the scheme of antigen determination as recommended by PERCH and KAUFFMANN; 49 "O" and 19 "H" sera prepared in the laboratory with standard strains were used.

Results. The strains isolated from urinary infections prevailingly belonged to certain serological types (O_3H_1, $O_{32}H_3$, and O_9H_3), in contradistinction to the strains isolate from water, which belonged to various serological types. This would point to the existence of certain "hospital" types.

As regards their susceptibility to drugs, the strains isolated from cases of urinary infection displayed increased degrees of susceptibility to Inamycin, Kanamycin, Formycetin, Chloramphenicol, Soframycin, and Neomycin.

In contradistinction to the strains isolated from polluted water, those isolated from cases of urinary infection displayed a very marked degree of resistance to Streptomycin, which might be due to their repeated contact with this antibiotic in the clinic.

PARTICULARITÉS DE LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DE CERTAINES SOUCHES DE *STAPHYLOCOCCUS* ET DE *SALMONELLA*, ISOLÉES DES MALADES SOUS L'INFLUENCE DU TRAITEMENT AUX ANTIBIOTIQUES

par

N. Nestoresco, Ecaterina Alexenco, Colette Georgesco, Sanda Ţupa, Lucia Szégli, et Ileana Caffé

(*Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Entérobactériacées*)

— Manuscrit reçu le 6 décembre 1960 —

L'étude de la résistance acquise « in vivo» des germes microbiens a fait l'objet des recherches cliniques, épidémiologiques et expérimentales.

D'après les données signalées par la littérature, c'est surtout la clinique de la tuberculose qui a offert le plus grand nombre d'observations concernant la résistance acquise du *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques. Cette particularité est due aux grandes possibilitées présentées en clinique par la tuberculose, qui permettent d'isoler du même malade, pendant longtemps et à plusieures reprises — avant et après traitement — différentes variantes de la même souche infectante de b. tuberculeux.

Au cours des maladies infectieuses à évolution aiguë — de courte durée — la recherche de l'installation de la résistance des germes aux antibiotiques — par isolements successifs — est plus rarement signalée et par conséquent, moins connue.

Nous nous sommes donc proposé d'étudier systématiquement la sensibilité des germes aux antibiotiques, par isolements successifs — avant, pendant et, dans la limite des possibilités, aussi après le traitement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons poursuivi un nombre de malades atteints d'infections staphylococciques, ainsi que des malades avec infections produites par des germes du groupe *Salmonella*, parmis lesquels *S. typhi*, *S. enteritidis Gärtner* et *S. typhi murium*, provenant de différents hopitaux.

Les germes ont été isolés des produits pathologiques récoltés avant et pendant l'administration des antibiotiques, jusqu'à la guérison clinique ou l'exitus du malade. Dans certains cas de salmonelloses, on a réussi à isoler des germes même quelques semaines après la guérison clinique. En général, on a isolé de différents produits pathologiques de chaque malade 3—12 souches, dans l'intervalle de 5—40 jours; durant cette période, les malades avaient reçu, à part le

traitement adjuvant correspondant, imposé par chaque cas clinique, les antibiotiques indiqués.

Toutes les souches isolées ont été étudiées du point de vue morphologique, caractères de culture et caractères biochimiques. Pour l'identification sérologique des *Salmonella* on a effectué des agglutinations sur lame et en tube, vis-à-vis des sérums spécifiques de groupe et de type. Pour les staphylocoques, on a étudié en plus, les caractères de pathogénité « in vitro» (production de coagulase, fibrinolysine, hémolysine, pigment et fermentation du mannite). Les souches de staphylocoque qui étaient positives à ces tests, ainsi que les souches de *S. typhi* et *S. typhi murium*, ont été étudiées aussi du point de vue de la lysosensibilité aux phages spécifiques. Pour une partie des souches (50%) on a également recherché la lysogénie.

Chaque souche a été simultanément testée « in vitro» pour la sensibilité aux antibiotiques utilisés pour le traitement des malades et aussi vis-à-vis d'autres antibiotiques, nommément: pénicilline, streptomycine, chloramphénicol, auréomycine, terramycine, érythromycine et néomycine. La sensibilité a été testée selon la méthode diffusimétrique Erna Lund.

RÉSULTATS

L'étude de 24 cas cliniques, — 4 infections staphylococciques différentes (septicémies et pyélo-néphrites) et 20 cas de scarlatine (dont on a isolé des staphylocoques du rhino-pharynx) — a permis de constater l'absence de modifications morphologiques, culturelles et biochimiques des souches isolées pendant et après le traitement, par rapport aux souches isolées avant l'institution du traitement. On a également constaté la stabilité du type phagique des souches isolées successivement du même malade. Ainsi, dans un cas clinique de septicémie, les staphylocoques isolés du sang, du pus de l'emphysème pleural, du pus d'un phlegmon, ainsi que des organes (nécropsie) ont présenté un même spectre de lysosensibilité (6/7/53/54/75/77).

En ce qui concerne le comportement des souches envers les antibiotiques on a constaté en général des modifications peu importantes, manifestées par une faible augmentation de la résistance des souches isolées – pendant ou après traitement — par rapport à celles obtenues avant le traitement.

Parmi les 41 souches, isolées à plusieurs reprises du sang et des fèces de six cas de fièvre typhoïde, on n'a non plus constaté de modifications morphologiques, culturelles et biochimiques sous l'influence du traitement aux antibiotiques.

En ce qui concerne la structure antigénique, on n'a enregistré aucune modification essentielle, à part quelques différences qualitatives dans le contenu de l'antigène Vi, constatées par examens répétés.

La détermination du type bactériophagique a mis en évidence la constance des lysotypes. De même, le caractère de lysogénéité des souches n'a pas été influencé par l'action des antibiotiques; en effet, dans certains cas cliniques on n'a isolé que des souches lysogènes, dans d'autres des souches non-lysogènes.

La recherche de la sensibilité « in vitro» vis-à-vis des antibiotiques — et spécialement vis-à-vis du chloramphénicol, qui a constitué la base du traitement — n'a mis en évidence que des différences minimes, insignifiantes. Les mêmes résultats ont été obtenus dans le cas de souches de *S. enteritidis* et *S. typhi murium*,

isolées à plusieurs reprises de 6 malades atteints de toxi-infections alimentaires.

L'isolement répété des souches microbiennes des malades, présentant une forme aiguë de maladie, a permis d'obtenir des résultats comparables à ceux réalisés expérimentalement « in vivo». Ainsi SCHNITZER et GRÜNBERG (1957) montrent que la résistance des bactéries « in vivo » varie en rapport avec la substance chimiothérapeutique employée.

Tandis que « in vivo » la résistance des bactéries peut rapidement apparaître sous l'influence de l'éthylhydrocupréine, elle s'installe plus difficilement vis-à-vis des sulfamides et nécessite un plus long délai pour la streptomycine, la pénicilline et l'isoniaside.

D'autre part, l'apparition de la résistance dépend aussi de la durée de la maladie, du contact avec les antibiotiques, ainsi que de la dose d'antibiotique en action. En ce qui concerne les cas d'infection dus aux *Salmonella,* il paraît que la dose active de chloramphénicol nécessaire à la guérison clinique ne serait pas en corrélation avec la dose capable d'induire la résistance du germe à l'antibiotique.

Il n'est pas exclu qu'une série de facteurs inconnus interviennent dans ce processus chez l'homme, ce qui empêcherait l'installation de la résistance des germes au chloramphénicol; ces facteurs semblent être absents en cas d'installation de la résistance vis-à-vis d'autres antibiotiques, tels la pénicilline et la streptomycine.

CONCLUSIONS

On a étudié les modifications des caractères morphologiques, de culture, biochimiques, de la structure antigénique, de la sensibilité envers les phages spécifiques et vis-à-vis des antibiotiques, des souches isolées de 36 malades présentant des formes aiguës de maladie (staphylococcie, fièvre typhoïde et toxi-infections alimentaires) sous l'influence de l'antibiothérapie.

— Les souches isolées pendant l'application du traitement n'ont présenté aucune modification essentielle du point de vue biochimique, sérologique, de la lysosensibilité phagique et de la lysogénie, par raport aux souches isolées avant le traitement.

— Sous l'influence des antibiotiques administrés on a observé dans nos conditions de travail — une légère diminution, peu signifiante, du degré de sensibilité des souches isolées pendant ou après le traitement avec les antibiotiques respectifs.

— La diminution du degré de sensibilité paraît dependre de l'antibiotique employé, d'une part, de l'espèce et de la souche respective, d'autre part. Il semble que l'installation de la résistance — dans les conditions présentées par les organismes avec formes aiguës de maladie, soumis au traitement aux antibiotiques — s'effectue plus lentement que celle obtenue « in vitro ».

BIBLIOGRAPHIE

1. BAUER A. W., PERRY M. D. et KIRBY W. M. — J.A.M.A., 1960, **173,** 475.
2. BLAIR J., CARR M. et BUCHMAN J. — Journ. of Immunol., 1945, **52,** 281.

3. Nestoresco N., Popovici M. et Alexenco E. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 69.
4. Schnitzer J. R. et Grünberg E. — Drugs resistance of microorganisms, 1957, Academic Press inc. Publishers, New-York.

ОСОБЕННОСТИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ВЫДЕЛЕННЫХ У БОЛЬНЫХ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ СТАФИЛОКОККА И САЛМОНЕЛЛ — ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛЕЧЕНИЯ АНТИБИОТИКАМИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В настоящей работе авторы исследовали появление резистентности к антибиотикам у болезнетворных возбудителей под влиянием лечения. В этих целях они наблюдали 38 больных различными стафилококковыми инфекциями, скарлатиной, а также и инфекциями, вызванными салмонеллами, изучая биологические признаки и резистентность возбудителей, выделенных до-, во время и после лечения антибиотиками (у больных, у которых могли быть выделены эти возбудители).

Штаммы, выделенные во время лечения антибиотиками, не обладали изменениями, существенными с биологической, серологической точек зрения, а также с точки зрения фаговой лизочувствительности и лизогении — по сравнению с штаммами, выделенными до лечения.

В условиях производившейся авторами работы, под влиянием назначаемых антибиотиков, было отмечено только имеющее малое значение снижение степени чувствительности у штаммов, выделенных во время или же после лечения соответствующими антибиотиками.

Снижение чувствительности, надо полагать, зависит с одной стороны от качеств примененного антибиотика, а с другой стороны — от вида, а также и от соответствующего штамма.

Повидимому, наступление резистентности в условиях, которые имеются в организме при острой форме болезни во время лечения антибиотиками, происходит более медленно, чем это наблюдается in vitro.

EIGENTÜMLICHKEITEN DER WIDERSTANDSFÄHIGKEIT GEGEN ANTIBIOTIKA BEI EINIGEN VON UNTER DEM EINFLUSS DER BEHANDLUNG MIT ANTIBIOTIKA STEHENDEN KRANKEN ISOLIERTEN *STAPHYLOKOKKEN* UND *SALMONELLASTÄMMEN*

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird das Auftreten des Widerstandsfähigkeit von Keimen gegen Antibiotika "*in vivo*", unter der Einwirkung der Behandlung untersucht. Zu diesem Zweck wurden von 38 an Staphylokkeninfektionen, Scharlach oder Salmonellainfektionen leidenden Kranken die Keime vor, während und nach Abschluss der Behandlung (wenn dies noch möglich war) isoliert und ihre biologischen Merkmale und Widerstandstandsfähigkeit untersucht.

Im Vergleich mit den vor der Behandlung isolierten, wiesen die während der Behandlung mit Antibiotika isolierten Stämme hinsichtlich ihrer biochemischen und serologischen Eigenschaften sowie ihrer Lysosensibilität für Phagen und ihrer Lysogenität, keine grundlegenden Veränderungen auf.

Unter unseren Arbeitsbedingungen konnte bei den während oder nach der Behandlung isolierten Stämmen bloss eine recht unbedeutende Abnahme der Empfindlichkeit für das verabreichte Antibiotikum festgestellt werden.

Diese Abnahme der Empfindlichkeit scheint einerseits mit dem verwendeten Antibiotikum, andererseits mit der Artzugehörigkeit und dem Stamm des betreffenden Keimes in Verbindung zu stehen.

Anscheinend tritt die Widerstandsfähigkeit unter den Bedingungen, die in einem an einer akuten Krankheitsform leidenden Organismum vorherrschen, langsamer ein als "*in vitro*".

PECULIARITIES OF RESISTANCE TO ANTIBIOTICS IN SOME STRAINS OF *STAPHILOCOCCI* AND *SALMONELLAE* ISOLATED FROM PATIENTS UNDERGOING ANTIBIOTIC TREATMENT

SUMMARY

In the present work, the "*in vivo*" acquirement by germs of resistance to antibiotics, under the influence of treatment, has been investigated. To this end, in a number of 38 patients suffering from staphylococcal infections, scarlet fever, or *Salmonella* infections, the biological characters and the resistance of the germs were determined before, during, and after treatment (in those cases in which the germs could still be isolated).

As compared to the strains isolated before treatment was started, those isolated during the course of antibiotic treatment did not display any essential changes as regards their biochemical and serological properties or their lysosensitivity and lysogenicity.

Under the conditions of the present investigation, the sole change which was observed to occur under the influence of the antibiotics administred consisted in a hardly significant decrease of susceptibility in the strains isolated during and after treatment with the respective antibiotics.

This decrease of susceptibility appears to be related to the type of antibiotic used on the one hand, and the respective species and strain on the other.

In would appear that under the circumstances prevailing in the body during acute disease and antibiotic treatment, resistance is slower to set in then "*in vitro*".

ÉTUDES EXPÉRIMENTALES CONCERNANT LA RÉSISTANCE ACQUISE DES STAPHYLOCOQUES AUX ANTIBIOTIQUES « IN VIVO »

par

MARCELLA POPOVICI et ECATERINA ALEXENCO

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Entérobactériacées)

— Manuscrit reçu le 6 décembre 1960 —

Les données de la littérature, ainsi que nos observations sur l'induction « in vitro » de la résistance microbienne aux antibiotiques, montre que le phénomène est conditionné par de multiples facteurs qui dépendent de la nature de l'antibiotique employé, des doses actives, de la durée du contact, d'une part, et d'autre part de la population microbienne sur laquelle elles agissent, ainsi que de l'ambiance dans laquelle ces éléments se trouvent (milieu de culture, température etc.). Cependant, lorsqu'il s'agit de l'installation de la résistance aux antibiotiques « in vivo », le problème est encore plus compliqué par le fait qu'aux facteurs énumérés s'ajoutent toutes les particularités de l'animal hôte.

Vu cette situation, il était naturel que l'étude expérimentale concernant l'acquisition de la résistance des germes microbiens aux antibiotiques « in vivo » rencontrât de grandes difficultés et que les résultats décrits soient encore disparates et souvent contradictoires.

L'étude de la résistance des bactéries « in vivo» dépend, en premier lieu, de la reproduction d'une infection expérimentale.

Pour le staphylocoque la réalisation d'un modèle d'infection expérimentale se heurte à la difficulté de ne pas avoir à notre disposition un animal de laboratoire présentant une réceptivité convenable, plus ou moins constante. La plupart des études effectuées sur la résistance des staphylocoques « in vivo » ont été faites sur la souris.

RAKE et coll. (1944), par vingts passages en série sur des souris traitées avec de la pénicilline, ont obtenu un certain degré de résistance chez un staphylocoque doré, résultat interprété par rapport à l'efficacité du traitement « in vivo », mais sans être confirmé par les tests de sensibilité « in vitro ».

Dans des recherches plus récentes, FORNI et PANCRAZIO (1959) — par des expériences effectuées également sur la souris — ont obtenu un certain degré de résistance des staphylocoques aux antibiotiques; néanmoins cette résistance était de beaucoup inférieure à celle réalisée « in vitro », après contact répété avec les substances respectives.

Dans le présent travail nous nous sommes proposé d'étudier l'installation de la résistance des staphylocoques aux antibiotiques « in vivo » pendant l'infection expérimentale chez le lapin, sous l'influence du traitement avec de la pénicilline et de la streptomycine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Comme souche infectante on a utilisé une culture de staphylocoque lysotype 80 81, qui était très sensible à la pénicilline et modérément sensible à la streptomycine.

Les expériences ont été effectuées sur un nombre de 14 lapins, infectés par voie intraveineuse, par 1 ml suspension microbienne en sérum physiologique, à densité de 1 milliard germes/ml.

On a séparé les lapins infectés en deux lots:

I-er lot: 6 lapins traités avec de la pénicilline, administrée journellement par voie intramusculaire en dose de 2000 U./kilocorps.

II-e lot: 6 lapins, traités avec de la streptomycine administrée dans les mêmes conditions en dose de 3000 γ/kilocorps.

Deux lapins, servant comme témoins, n'ont reçu aucun traitement.

Les animaux décédés ou sacrifiés à des intervalles variés de temps ont été autopsiés, effectuant les ensemencements des organes et l'examen macroscopique des lésions.

Les staphylocoques obtenus ont été étudiés du point de vue des caractères de pathogénité « in vitro » (production de coagulase, fibrinolysine, élaboration de pigment, action hémolytique, fermentation de la mannite), de la sensibilité au phages spécifiques à l'aide de la méthode standard de lysotypie, ainsi que de la sensibilité à la pénicilline et streptomycine.

En vue de l'étude du degré de sensibilité ou de résistance des souches aux antibiotiques on a utilisé la méthode diffusimétrique selon les indications du procédé indiqué par ERNA LUND, ainsi que la méthode des dilutions, en déterminant la dose bactériostatique et bactéricide, vis-à-vis de quantités constantes de germes (environ 1000 germes pour 1 ml dilution d'antibiotique en bouillon).

Les colonies résistantes, apparues à la surface des aires d'inhibition ont également été étudiées d'après les mêmes critériums.

RÉSULTATS

Lot. I. Les 6 lapins de ce lot, traités avec de la pénicilline par inoculation journalière, en dose de 6000 U. ont survécu à l'infection; ils ont été sacrifiés à différents intervalles, comme suit:

— 2 lapins, traités pendant 5 jours (5 inoculations) ont été sacrifiés le 6-e jour; des organo-cultures effectuées des reins – qui présentaient de petits abcès — on a isolé le staphylocoque 80/81;

— 2 lapins traités pendant 12 jours (12 inoculations) ont été sacrifiés le 13-e jour; les organo-cultures effectuées des fragments d'organes n'ont plus mis en évidence le staphylocoque.

— 2 lapins traités pendant 19 jours (19 inoculations) ont été sacrifiés le 20-e jour; chez ces animaux on n'a non plus décelé de staphylocoque.

Les souches de staphylocoque isolées des deux premiers animaux, après application du traitement indiqué, ont gardé leur sensibilité à la pénicilline, tout comme la souche initiale (zone d'inhibition de 3 – 4 cm ⌀ sous l'action de 10 U. pénicilline — méthode d'ERNA LUND; effet bactéricide à 0,14— méthode des dilutions).

De même, ces souches ont conservé leur sensibilité initiale à la streptomycine.

Le type bactériophagique est resté inchangé.

Lot II. Des 6 lapins, traités avec de la streptomycine (inoculation journalière de 10.000 γ streptomycine), 3 ont succombé et 3 ont survécu comme suit:

— 1 lapin (traité par un seule inoculation) a succombé après 48 heures;

— 1 lapin traité pendant 3 jours (3 inoculations) a succombé le 4-e jour;

— 1 lapin traité pendant 5 jours (5 inoculations) a succombé le 6-e jour;

Un des lapins survivants traité pendant 12 jours (12 inoculations) a été sacrifié le 13-e jour. A la nécropsie de ces animaux ont a constaté des abcès aux reins et au niveau du myocarde; les organo-cultures ont mis en évidence le staphylocoque 80/81.

Les deux derniers animaux, traités pendant 19 jours (19 inoculations) ont été sacrifiés le 20-e jour; on n'a plus isolé le staphylocoque des organo-cultures effectuées.

De même que dans les cas de souches isolées chez les animaux traités avec de la pénicilline, les staphylocoques isolés chez ce lot d'animaux n'ont présenté aucune modification de la sensibilité aux antibiotiques par rapport aux souches infectantes (zone d'inhibition de 2,2 – 2,3 cm ⌀ avec des colonies résistantes en contact avec 500 γ streptomycine — méthode ERNA LUND; effet bactéricide en présence de 75 γ — méthode des dilutions).

Les caractères de pathogénité et le type bactériophagique des souches isolées après traitement, ainsi que les colonies résistantes apparues sur l'aire d'inhibition, ont été en tous points comparables à la souche d'origine.

Les deux lapins témoins, non-traités, ont succombé le 6-e et, respectivement le 13-e jour, présentant des abcès au niveau des reins, du foie et du poumon.

Les ensemencements effectués des organes mentionnés ont permis d'isoler le staphylocoque lysotype 80/81.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Il ressort des résultats présentés que l'inoculation par voie intraveineuse des lapins, avec culture de staphylocoque lysotype 80/81, en dose de 1 milliard de germes, a produit une infection septicémique qui a provoqué la mort des animaux dans l'intervalle de 6—13 jours, avec abcès dans les organes (reins, foie, cœur, poumons).

L'application du traitement avec de la pénicilline a eu comme effet la guérison de l'animal, après moins de 12 injections journalières de 2000 U. par kilocorps.

L'application de la streptomycine a exigé un traitement de plus longue durée, après 12 injections le germe pouvant être encore isolé des organes.

Le traitement des lapins infectés par voie intraveineuse avec un staphylocoque 80/81 par de la pénicilline et de la streptomycine, n'a mis en évidence,

dans nos conditions de travail, aucune modification des caractéristiques de la souche infectante. En effet la sensibilité aux antibiotiques des staphylocoques de type phagique 80/81, isolés des animaux morts ou sacrifiés, a été comparable à la sensibilité présentée par la souche d'origine.

Les résultats de ces expériences concordent avec certaines observations effectuées en poursuivant le développement de la résistance des souches de staphylocoque chez l'homme, à la suite du traitement aux antibiotiques. Ainsi, dans leurs récentes études sur la dynamique de la résistance aux antibiotiques des staphylocoques isolés de différentes infections staphylococciques (septicémies, pyélo-néfrites, phlegmons etc.), sous l'influence de l'antibiothérapie, Nestoresco et coll (1960) n'ont mis en évidence qu'une faible augmentation de la résistance des souches isolées pendant ou après un traitement de courte durée.

Par contre, certains auteurs ont signalé des modifications marquées du degré de résistance du staphylocoque après l'application prolongée de la pénicilline en cas d'infections a évolution lente. Dans cet ordre d'idées, Blair et coll., étudiant le développement de la résistance à la pénicilline des staphylocoques isolés pendant le traitement de 41 cas d'ostéomyélite chronique, ont montré que le temps nécessaire au développement d'un maximum de résistance a été de 1—12 semaines de traitement.

Des données mentionnées plus haut, il résulte que la résistance acquise « in vivo» sous l'influence des traitements aux antibiotiques dépend, en grande mesure, de la durée du traitement.

BIBLIOGRAPHIE

1. Blair J., Carr M. et Buchman J. — The Journ. of Immunol., 1945, **52**, 281.
2. Forni p.v. et Pancraziom. — Giornale di Batteriologia, Virologia ed Immunologia, 1952, **52**, 432.
3. Nestoresco N., Popovici M. et Alexenco E. — Arch. Roum. Path. Exp. et de Microbiologie., 1960, **19**, 69.
4. Nestoresco N., Alexenco E., Georgesco C., Țupa S., Szégli L. et Caffé I., — Arch. Roum. de Pathol. expér. et de Microbiologie, 1961, **20**, 381.
5. Rake G. — J. Immunol., 1944, **48**, 271.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ВОПРОСУ ПРИОБРЕТЕНИЯ СТАФИЛОКОККАМИ IN VIVO РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В этой работе авторы исследовали наступление резистентности к антибиотикам у стафилококков in vivo во время экспериментальной инфекции у кроликов — под влиянием лечения стрептомицином и пенициллином. Внутривенное введение кроликам культуры лизотипного стафилококка 80/81 в дозе 1 миллиард возбудителей, обусловило септицемическую инфекцию и последующую смерть животных спустя 6—13 дней, с абсцессами в органах. Применение лечения пенициллином имело своим результатом выздоровление животных после меньше чем 12 ежедневных инъекций по 2000 Ед/кг веса тела.

Назначение стрептомицина потребовало более продолжительного лечения: после 12 инъекций возбудитель еще мог быть выделен из органов.

Под влиянием лечения пенициллином и стрептомицином не было отмечено изменений патогенных признаков и чувствительности к специфическим фагам.

Чувствительность к антибиотикам со стороны стафилококков типа 80/81, выделенных после лечения (примененного в вышеописанных условиях) у забитых или же умерших животных оказалась сходной с чувствительностью исходного штамма.

Наступление резистентности in vivo под влиянием лечения антибиотиками обусловливается среди других причин, повидимому, также и продолжительностью лечения.

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE VON STAPHYLOKOKKEN « IN VIVO » ERWORBENE WIDERSTANDSFÄHIGKEIT GEGEN ANTIBIOTIKA

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird die Erwerbung der Widerstandsfähigkeit gegen Antibiotika durch Staphylokokken „in vivo", im Verlauf der experimentellen Infektion des Kaninchens, unter dem Einfluss der Penizillin- und Streptomyzinbehandlung untersucht. Die intravenöse Einspritzung einer Dosis von 1 Milliarde Keimen einer Staphylokokkenkultur des Lysotypus 80/81 rief bei Kaninchen eine septikämische Infektion hervor, die in 6—13 Tagen zum Tod der Tiere, mit Abszessen in den Organen führte. Penizillinbehandlung führte zur Heilung der Tiere nach weniger als 12 täglichen Injektionen von je 2000 E/Kilogramm Körpergewicht. Bei Verabreichung von Streptomyzin war eine längere Behandlungsdauer erforderlich, wobei der Keim nach 12 Injektionen noch aus den Organen isoliert werden konnte.

Veränderungen der pathogenen Eigenschaften oder der Empfindlichkeit für spezifische Phagen unter dem Einfluss der Behandlung mit Penizillin und Streptomyzin konnten nicht beobachtet werden.

Bei Staphylokokken des Typus 80/81, die nach der angegebenen Behandlung von geopferten oder verendeten Tieren isoliert wurden, erwies sich die Empfindlichkeit für Antibiotika gleichfalls als mit derjenigen des Ausgangsstammes vergleichbar.

Die Erwerbung der Widerstandsfähigkeit "in vivo" unter dem Einfluss der Behandlung mit Antibiotika scheint, unter anderem, von der Dauer der Behandlung abzuhängen.

EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS CONCERNING THE "IN VIVO" ACQUIREMENT BY STAPHYLOCOCCI OF RESISTANCE TO ANTIBIOTICS

SUMMARY

The present investigation concerns the "in vivo" acquirement by staphylococci of resistance to antibiotics in the course of experimental infection in rabbits subjected to penicillin and streptomycin treatment. Inoculation of rabbits by the intravenous route with 1 milliard germs of a lysotype 80/81 staphylococcus culture caused septicaemic infections which resulted in death of the animals within 6—13 days. Abcesses were present in the viscera. Penicillin treatment resulted in recovery of the animals following less than 12 daily inoculations of 2000 U/kg body weight. Streptomycin treatment required a longer period of administration, since after 12 inoculation the germs could still be isolated from the viscera.

No changes concerning the pathogenic character of the germs or their suceptibiliîy to specific phages were found to occur under the influence of penicillin or streptomycin treatment.

The suceptibility to antibiotics of lysotype 80/81 staphylococci isolated at the end of the treatment (under the conditions described) from sacrificed or dead animals, was likewise found to be of the same order as that of the original strain.

The "in vivo" acquirement of resistance under the influence of antibiotic therapy appears to be dependent, among other factors, on the duration of the treatment.

INFLUENCE DE L'EMPLOI CYCLIQUE DES ANTIBIOTIQUES SUR LES CARACTÈRES DES STAPHYLOCOQUES ISOLÉS DANS UNE MATERNITÉ

par

Marcella Popovici
N. Nestoresco
Ecaterina Alexenco
Luiza Soare
Elena Ghioni
(Institut «Dr. I. Cantacuzino» Service des Entérobactériacées)

D. Alessandresco
G. Teodoru
(Maternité Polizu)

— Manuscrit reçu le 29 novembre 1960 —

Il est aujourd'hui généralement admis qu'il existe une étroite relation entre l'emploi d'un antibiotique et la proportion de souches résistantes à la substance respective; en effet, dans le cas où l'on cesse l'administration d'un antibiotique, se produit une tendance vers un équilibre biologique, dans lequel les mutantes résistantes de la population microbienne diminuent en faveur des mutantes sensibles. Néanmoins, les données de la littérature concernant l'étude de la corrélation entre la quantité d'antibiotiques administrés et la fréquence des souches résistantes sont limitées et souvent contradictoires.

Ainsi, Waisbren et Strelitzer (1957—1958) (5), étudiant les variations de la sensibilité aux antibiotiques des souches de staphylocoques par rapport à leur application pendant 5 ans, ne constatent pas une relation nette entre l'emploi d'un antibiotique et la proportion de staphylocoques résistants.

D'autres auteurs, tels: Barber et coll. (1958) (1), Bauer et coll. (1960) (2), Hofstad et Vogelsang (3), etc. sont arrivés à des conclusions nettement différentes, dans le sens de l'existence d'un rapport de proportionnalité entre la quantité d'antibiotique employée et la fréquence de la résistance des staphylocoques isolés.

Parmi les mesures de prophylaxie contre les infections staphylococciques, nous avons étudié dans une maternité le potentiel d'infection, en effectuant périodiquement le contrôle des porteurs de staphylocoques pathogènes.

Etant donné que ces derniers temps, dans cette maternité, on a appliqué différents schémas de traitement, basés sur le principe de la substitution périodique des antibiotiques, en vue de prévenir l'apparition des variantes résistantes, nous nous sommes proposé d'étudier le caractère propre des souches de staphylocoques isolées pendant cette période; nous avons également essayé d'établir dans quelle mesure et par quel mécanisme la substitution de certains antibiotiques pourrait influencer le comportement des souches isolées vis-à-vis des substances respectives, ainsi que vis-à-vis des autres antibiotiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a étudié 1034 souches de staphylocoques isolées du personnel de la maternité et des mères, au cours de deux examens effectués à un intervalle de trois années (1957, respectivement 1960), ainsi que d'une série d'infections staphylococciques existantes dans la maternité en 1957, au moment du prélèvement.

Les staphylocoques isolés ont été étudiés par les tests classiques de pathogénité « in vitro » (production de la coagulase, fibrinolysine, activité hémolytique, production de pigment et fermentation de la mannite).

A l'aide de ces tests, on a différencié 410 souches de staphylocoques pathogènes (166 en 1957 et 244 en 1960), chez lesquelles on a déterminé le comportement envers les antibiotiques, ainsi que la lysosensibilité envers les phages spécifiques.

Les tests de sensibilité « in vitro » des souches ont été effectués par la méthode diffusimétrique ERNA LUND, vis-à-vis des antibiotiques couramment employés: pénicilline, streptomycine, auréomycine, chloramphénicol et érythromycine. Selon les indications de cette méthode, nous avons utilisé des rondelles en papier filtre (15 mm ⌀) sur lesquelles on a déposé 0,05 ml des concentrations d'antibiotiques suivants: pénicilline 200 U./ml, chloramphénicol, auréomycine et érythromycine 1000 γ/ml et stréptomycine 10.000 γ/ml.

L'interprétation des résultats a été faite selon les dimensions de l'aire d'inhibition, d'après le schéma suivant:

15 mm ⌀ = résistance
16—20 mm ⌀ = résistance relative
21—29 mm ⌀ = sensibilité modérée
30 mm ⌀ = sensibilité accentuée

La détermination du type bactériophagique a été effectuée d'après la méthode recommandée par le Laboratoire de Références pour le Staphylocoque, de Londres (R.E.O. Williams), utilisant la série de 21 preparations phagiques qui constituent le set de base établi par le Comité International pour la lysotypie des Staphylocoques, ainsi que les préparations additionnelles: 51, 42B, 47B, 47C, 52B, 42F, 31, 42C, 44, 44A, 47A, 69, 78 et 81.

Dans cet intervalle de temps, l'administration des antibiotiques dans la maternité a subi les fluctuations suivantes:

Au cours de l'année 1957 et 1958, les antibiotiques majeurs étaient représentés par la pénicilline et la streptomycine, administrées dans un but tant curatif que prophylactique.

Au début de l'année 1959 on a supprimé l'utilisation prophylactique des deux antibiotiques mentionnés, ce qui a eu comme résultat une diminution de leur emploi, étant appliqués seulement à des fins curatives.

A partir du 1-er janvier 1960 on a exclu de l'arsénal thérapeutique de la maternité la pénicilline et la streptomycine, introduisant sur large échelle le chloramphénicol, seul ou en association avec des sulfamides. Les tetracyclines ont été peu utilisées et seulement dans le cas où l'action du chloramphénicol n'était pas satisfaisante.

Au cours de la dernière année, on a appliqué dans quelques cas l'érythromycine.

RÉSULTATS

L'analyse comparative de la sensibilité aux cinq antibiotiques mentionnés des stapylocoques pathogènes isolés au cours des examens effectués en 1957 et 1960 (6 mois après la substitution totale de la pénicilline et de la streptomycine) a mis en évidence une série des différences, consignées dans le tableau I.

Tableau I

	Pénicilline	Streptomycine	Chloramphénicol	Auréomycine	Erythromycine
1957 Staphylocoques résistants	69,88%	61,45%	7,83%	15,06%	0
1960 Staphylocoques résistants	58,20%	18,44%	8,60%	7,33%	2,05%

Ajoutons que nous avons considéré comme sensibles les staphylocoques qui, par rapport aux dimensions de la zone d'inhibition, se sont montrés fortement ou modérément sensibles.

Ainsi qu'il ressort du tableau I, on observe une diminution de la proportion des souches résistantes à la pénicilline, qui a baissé de 69,88% en 1957 à 58,20% en 1960 (6 mois après la substitution totale de la pénicilline). Dans le cas de la streptomycine, la baisse de l'incidence des staphylocoques résistants est beaucoup plus accentuée, tombant de 61,45% en 1957, à 18,44% en 1960.

Quant au chloramphénicol, largement utilisé en 1960 (6 mois avant le dernier contrôle) on note une très légère augmentation des souches résistantes.

Une baisse importante de l'incidence de la résistance a été enregistrée pour l'auréomycine (de 15,06% à 7,33%), dont l'emploi a été réduit.

Enfin, si en 1957 aucune des souches testées n'a été résistante à l'érythromycine, en 1960 on note, par contre, une proportion de 2,05% de souches résistantes, bien que l'application de cet antibiotique ait été limitée à quelques cas.

Afin d'apprécier le mécanisme de la baisse proportionnelle des souches résistantes comme conséquence de la suppression de l'antibiotique respectif, ainsi que d'établir si cette diminution était due à une substitution de souches ou à certaines modifications dans le cadre d'une même souche (apparition de mutantes sensibles ou disparition des mutantes résistantes), on a étudié comparativement les staphylocoques isolés d'une même personne, en 1957 et 1960. Les recherches effectuées sur une série de tels cas, ont montré des aspects différents; ainsi on a constaté:

— des sujets, porteurs de staphylocoques non-pathogènes en 1957, étaient porteurs de staphylocoques de type 80 en 1960;

— des cas où au dernier contrôle on avait isolé des staphylocoques appartenant à d'autres types phagiques et avec un comportement différent vis-à-vis des antibiotiques que les souches isolées en 1957; dans ces cas il était sans doute question d'une substitution de souches;

— des individus ayant présenté au dernier contrôle le même type bactériophagique de staphylocoque que celui isolé trois années auparavant mais à

comportement différent vis-à-vis des antibiotiques. Vu l'identité du type phagique des souches isolées, ces personnes ont été considérées comme porteurs persistants.

Parmi les porteurs persistants de cette catégorie, on a observé des modifications significatives dans 7 cas, intéressant surtout la sensibilité à la streptomycine envers laquelle les souches initialement résistantes ou relativement résistantes, sont devenues très sensibles ou modérément sensibles.

On a observé, par cas uniques, une augmentation du degré de sensibilité au chloramphénicol et à l'auréomycine, alors que la pénicillino-résistance n'a pas varié.

En vue d'établir l'intervention de certaines caractéristiques biologiques des souches respectives dans le processus d'acquisition ou de perte de la résistance des staphylocoques, on a poursuivi les modifications des réactions vis-à-vis des antibiotiques des souches isolées au cours des deux examens, par rapport à leur lysosensibilité aux phages spécifiques.

Dans le tableau II nous présentons le nombre de souches résistantes aux antibiotiques testés aux deux examens, dans le cadre de chaque groupe phagique.

Tableau II

Antibiotiques	Total staph. résistants		Groupe phagique I (type 80)		Groupe phagique II		Groupe phagique III		Groupe phagique IV	
	1957	1960	1957	1960	1957	1960	1957	1960	1957	1960
Pénicilline	116	141	46	103	3	1	66	35	0	0
Streptomycine	102	45	41	15	3	0	55	30	0	0
Chloramphénicol	13	21	5	6	0	0	8	14	0	0
Auréomycine	25	18	7	1	0	1	18	16	0	0
Erythromycine	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0

Ainsi qu'il ressort du tableau II, les souches du groupe III et celles appartenant au lysotype 80 se sont montrées plus susceptibles à subir des modifications de comportement aux antibiotiques.

DISCUSSION

Les résultats présentés permettent de constater une relation certaine entre l'intensité de l'emploi d'un antibiotique et la proportion de staphylocoques résistants à la substance respective. Ce rapport varie toutefois, en fonction de l'antibiotique considéré.

De toutes les substances étudiées, la streptomycine a montré la réversibilité la plus marquée, à la suite de la suppression du contact avec l'antibiotique. Considérée du point de vue génétique, à part le mécanisme de sélection qui intervient dans le maintien de l'équilibre d'une population microbienne, la réversibilité de la streptomycino-résistance des souches de staphylocoques, constituerait une manifestation phénotypique, en opposition avec le comportement vis-à-vis de la pénicilline, où la persistance de la résistance semble être liée à une manifestation génotypique.

Ces faits pourraient donc également expliquer les mécanismes différents de l'installation de la résistance chez certains germes microbiens envers la pénicilline et la streptomycine.

Le caractère phenotypique que revêt la résistance à la streptomycine serait dû plutôt à un phénomène d'adaptabilité aux antibiotiques, sans interventions fondamentales dans le substratum héréditaire de la bactérie, tandis que dans le cas de la pénicilline, ces interventions paraissent avoir une importance particulière.

En accord avec les données de la littérature, les staphylocoques étudiés sont devenus plus difficilement résistants envers le chloramphénicol, ce qui explique l'incidence réduite des souches résistantes à cet antibiotique.

En ce qui concerne l'érythromycine, nos recherches ont prouvé une fois de plus, la facilité des staphylocoques à établir leur résistance envers cette substance.

Au sujet du problème des modifications de la résistance envers les antibiotiques des souches isolées des porteurs persistants de staphylocoque, appartenant à un même type phagique, les résultats obtenus prouvent « in vivo » les constatations faites par quelques uns d'entre nous (4) sur la résistance induite « in vitro » des staphylocoques par différents antibiotiques; dans ce travail on attirait l'attention sur la haute capacité et la vitesse avec laquelle la streptomycine induit la résistance des staphylocoques, ainsi que sur le maintien de la réactivité phagique, indifféremment des modifications de sensibilité aux antibiotiques.

CONCLUSIONS

1. On a étudié les caractéristiques essentielles de 1034 souches de staphylocoques, isolées à trois années d'intervalle du personnel et des mères, dans une maternité.

2. On a étudié les relations entre les propriétés des souches isolées et la dynamique de l'emploi des antibiotiques, dans la maternité, pendant cet intervalle.

3. On a observé une concordance entre l'emploi ou la suppression d'un antibiotique et la proportion des souches résistantes, leur rapport étant variable, selon l'antibiotique considéré.

4. Les souches appartenant à certains groupes phagiques paraissent plus susceptibles à subir des modifications dans leur comportement envers les antibiotiques que les autres groupes phagiques.

5. Les modifications de la sensibilité aux antibiotiques n'affectent pas la sensibilité aux bactériophages spécifiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Barber M., Csillag A. et Medway A. J. — Brit. Med. J., 1958, 5109, 1377.
2. Bauer A. W., Perry D. M. et Kirby W. M. — J. Am. Med. Assoc, 1960, **173**, 475.
3. Hofstad T. et Vogelsang Th. — Acta Pathol. Microbiol. Scand, 1960, **48**, 149.
4. Nestoresco N., Popovici M. et Alexenco E. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 69.
5. Waisbren B. M. et Strelitzer C.L. — Antibiotic annual, 1957-1958, 350.

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИБИОТИКОВ НА ПРИЗНАКИ СТАФИЛОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ В ОДНОМ РОДИЛЬНОМ ДОМЕ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Авторы изучали влияние применения различных схем лечения и периодической перемены антибиотиков — на появление резистентных вариантов патогенных стафилококков.

В этих целях они исследовали признаки 1034 стафилококковых штаммов, выделенных при 2 зондажах с промежутком в 3 года у больничного персонала и у матерей, в одном из больших родильных домов.

Было отмечено соответствие между применением или прекращением назначения антибиотика и между числом резистентных штаммов: отношения оказались различными в зависимости от исследуемых антибиотиков.

Штаммы, принадлежащие определенным фаговым группам, легче подвергаются изменениям своих свойств в отношении антибиотиков.

Изменения чувствительности к антибиотикам не оказали влияния на чувствительность в отношении специфических бактериофагов.

DER EINFLUSS DER ZYKLISCHEN VERWENDUNG VON ANTIBIOTIKA AUF DIE MERKMALE DER IN EINER GEBÄRANSTALT ISOLIERTEN STAPHYLOKOKKEN.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde versucht den Einfluss verschiedener Verabreichungsschema sowie des periodischen Wechsels von Antibiotika auf das Auftreten widerstandsfähiger Varianten pathogener Staphylokokken zu bestimmen.

Zu diesem Zweck wurden die Merkmale von 1034, im Abstand von 3 Jahren von Müttern un dem Personal in einer grossen Gebäranstalt isolierten Staphylokokkenstämmen untersucht.

Zwischen der Verwendung oder Abstellung eines Antibiotikums und dem Prozentsatz widerstandsfähiger Stämme wurde eine Übereinstimmung festgestellt, doch sind die Verhältniszahlen, je nach dem betreffenden Antibiotikum verschieden.

Stämme, die einigen bestimmten Phagengruppen angehören, scheinen Veränderungen in ihrer Ansprechbarkeit auf Antibiotika leichter zu erleiden.

Veränderungen der Empfindlichkeit für Antibiotika waren nicht von Veränderungen n der Empfindlichkeit für spezifische Bakteriophagen begleitet.

THE INFLUENCE EXERTED BY THE CYCLICAL USE OF ANTIBIOTICS ON THE CHARACTERS OF STAPHYLOCOCCI ISOLATED IN A MATERNITY HOSPITAL

SUMMARY

It was the aim of this investigation to determine the influence exerted by the use of various schedules of treatment and by the periodic substitution of antibiotics on the appearance of resistant variants of pathogenic staphylococci.

To this aim, the characteristics of 1034 staphylococcus strains isolated at an interval of 3 years from the mothers and staff of a large maternity hospital, were investigated.

A concordance was found to exist between the use or suppression of an antibiotic and the proportion of resistant strains, the relation being, however, variable according to the antibiotic under consideration.

The strains belonging to certain phage groups were found more readily to undergo changes in their behaviour towards antibiotics.

Changes in susceptibility to antibiotics did not interfere with the susceptibility to specific bacteriophages.

LES ENDOTOXINES THERMOLABILES (NEUROTOXINES) DES GERMES GRAM NÉGATIFS *

I. LES NEUROTOXINES DU BACILLE *TYPHI MURIUM* «S» ET «R»

par

LYDIA MESROBEANU, I. MESROBEANU et NATALIA MITRICĂ

(Travail de l'Institut «Dr. I. Cantacuzino» — Section de Physiologie Microbienne et de la Chaire de Microbiologie de la Faculté de Médecine — Bucarest)

— Manuscrit reçu le 28 avril 1961 —

INTRODUCTION

A part la toxine protéique thermolabile (neurotoxine) du bacille de *Shiga* dont l'individualité chimique fut définitivement démontrée en 1936—1937 par BOIVIN et MESROBEANU (3), il existe dans la littérature un autre germe Gram négatif, le vibrion cholérique, chez lequel GRABAR et GALLUT (9, 10), FRETER (8) JENKIN et ROWLEY (13) ont décrit l'existence des protéines toxiques.

En ce qui concerne les Entérobactériacées, la conception courante est celle formulée par LANDY (15) dans un récent symposium, à savoir: «l'endotoxine (lipopolysaccharide) est la seule componente connue des *Enterobacteriaceae* qui semble être capable de contribuer de façon significative à l'état toxique caractéristique des infections dues aux germes Gram-négatifs».

Dans une série de recherches, qui font l'objet de ce mémoire et d'autres qui suivront, nous sommes parvenus à démontrer chez quelques germes Gram négatifs la possibilité d'extraire des endoprotéines toxiques (neurotoxines). Cette constatation, lorsque son étendue sera connue, devra modifier nos conceptions sur la structure antigénique des germes Gram-négatifs et jeter une nouvelle lumière sur le mécanisme de leur pathogénéité.

Notre premier mémoire concerne la mise en évidence et l'étude de la neurotoxine des variantes «S» et «R» du bacille *typhi murium* (b. Aertrycke-Bucarest).

MÉTHODES

Souches de typhi murium. Nous avons travaillé sur les mêmes souches de *typhi murium* (b. Aertrycke-Bucarest) utilisées en 1932—1933, par le Prof. BOIVIN et nous-mêmes, à l'isolement et l'identification pour la première fois de la nature de l'endotoxine «O» des germes Gram-négatifs. Depuis, ces souches sont entretenues dans notre laboratoire.

Cultures. En ce qui concerne le milieu et les conditions de culture nous devons spécifier qu'au cours de notre expérimentation nous avons employé diverses méthodes dans l'espoir

* Deux notes préliminaires ont été communiquées au V-e Congrès International de Biochimie de Moscou, août 1961.

que la production des neurotoxines serait en relation directe avec des conditions spéciales de culture. Ainsi, tant les bacilles de *typhi murium*, que beaucoup d'autres germes Gram-négatifs (*Coli* « *S* », *Proteus, Pyocyanique, Gärtner* « *R* » et « *S* », *Flexner, Sonne, Serratia marcescens*, etc.) ont été cultivés sur les milieux suivants:

gélose ordinaire 2%
gélose ordinaire 2% + 1% g amidon soluble
gélose ordinaire 2% + 10% ml lait écrémé
Milieu Hottinger gélosé 7‰ * en atmosphère de CO_2, 20%
Milieu Hottinger gélosé 7‰ + 1% g amidon en atmosphère de CO_2 20%
Milieu Hottinger gélosé 7‰ + 10% ml lait écrémé en atmosphère de CO_2 20%.

Pour la composition de ces milieux nous nous sommes également inspirés du travail de JORDAN et BURROWS (14), qui ont réussi à mettre en évidence des substances entérotoxiques dans les filtrats de culture des différents germes Gram-négatifs

Les cultures ont été incubées 24 à 48 heures à 37° et les germes récoltés ont été soumis à diverses méthodes d'extraction qui seront décrites plus loin. Il faut spécifier qu'aucun milieu de culture ne nous a donné de meilleurs résultats quant au rendement, par comparaison à la gélose ordinaire en aérobiose.

Méthodes d'extraction. Pour l'extraction des endoprotéines toxiques à partir des variantes « S » et « R » de *typhi murium*, nous avons adopté la même technique que celle qui fut mise au point pour l'extraction de la neurotoxine des bacilles *Shiga*. Nous avons appliqué cette technique, tant sur des germes frais que sur des germes deshydratés par l'acétone. L'extraction à partir des germes acétonés a été abandonnée au cours de l'expérimentation à cause des rendements très faibles, ou nuls en neurotoxine. Sur les germes vivants nous avons essayé plusieurs techniques d'extraction.

Méthode BOIVIN et MESROBEANU (3). Une culture fraîche de 18—24 heures, lavée par centrifugation avec de l'eau distillée est mise en suspension toujours dans de l'eau distillée à raison de 50 mg germes poids sec par ml. Dans le cas de l'utilisation des germes deshydratés par acétone, les suspensions ont été faites dans la même concentration, pour le reste la technique étant identique à celle appliquée aux germes frais. On additionne environ 30 ml chloroforme pour 100 ml suspension et on abandonne à l'autolyse pendant 3 jours, soit à la température du laboratoire, soit à 37°. On centrifuge la suspension jusqu'à clarification complète et le surnageant jaune-clair refroidi à +4° est amené à pH 3,5 avec de l'acide trichloracétique. Le précipité formé est redissous habituellement dans un dixième de son volume initial, avec du sérum physiologique et par addition de soude concentré jusqu'à pH 8,5

Extraction des neurotoxines par le désoxycholate de sodium. Une suspension de germes *typhi murium* « S » — 50 mg poids sec par ml — est autolysée pendant 3 jours à 37°, en présence du désoxycholate de sodium 1%. Centrifugation. Le surnageant précipité par l'acide trichloracétique à pH 3,5. Le précipité est ramené à pH 7,5 et le liquide clair soumis à la dialyse. Centrifugation pour éliminer le désoxycholate insolubilisé. Le surnageant précipité par trois volumes d'acétone. Le précipité redissous est à nouveau traité par l'acide trichloracétique à pH 3,5. Le précipité obtenu par redissolution et après dialyse, donne une solution claire, utilisée comme telle dans nos expériences.

Autolyse en présence du tampon phospate pH 8,6. Autolyse pendant 72 heures des germes en solution tampon phosphate pH 8,6 (f.i = 0,05) + merthiolate 1/10.000. Centrifugation. Le surnageant précipité à pH 3,5 par l'acide trichloracétique est redissous à pH 8,6 par addition de soude concentrée.

Autolyse en présence du tampon véronal. Autolyse de 72 heures en tampon véronal pH 8,6 (f. i. = 0,05) + merthiolate 1/10.000. Centrifugation. Le surnageant clair précipité à pH 3,5 avec l'acide trichloracétique à pH 8,6.

Méthode de van HEYNINGEN (12). Nous avons utilisé la méthode de van HEYNINGEN, préconisée pour la purification de la neurotoxine Shiga. Dissolution par le KOH à pH 11 des bactéries tuées à 56°. Le surnageant des bactéries dissoutes est traité par le phosphate de calcium à pH 7,6. Après élimination du précipité, le liquide décoloré est dialysé dans de

* Le milieu de Hottinger gélosé 7‰ est utilisé dans l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » à la préparation de la toxine alpha staphylococcique (16).

l'eau distillée. Quant à la neurotoxine du bacille de *Shiga*, van HEYNINGEN spécifie que pendant la dialyse la toxine devient insoluble, ce qui permet sa concentration et purification ultérieure.

La neurotoxine du bacille Aertrycke « S » ou « R » ne précipitant pas au cours de la dialyse, nous avons expérimenté dans nos essais comparatifs le dialysat dans ce stade de purification.

L'endotoxine « O » a été extraite par l'acide trichloracétique selon la méthode de BOIVIN et MESROBEANU et la préparation de l'haptène polysaccharidique a été effectuée par hydrolyse de l'endotoxine « O » en milieu 1% d'acide acétique. Le polysaccharide est précipité en ajoutant au surangeant trois volumes d'acétone.

PRÉPARATION DES ANTISÉRUMS. RÉACTIONS D'AGGLUTINATION ET DE PRÉCIPITATION ET RÉACTIONS EN GEL D'AGAR

Pour la préparation des antisérums, nous avons utilisé les antigènes suivants:

bacille *typhi murium* « S » inactivé 1 heure à 56°
bacille *typhi murium* « R » inactivé 1 heure à 56°
endotoxine « O » extraite du bacille *typhi murium* « S »
neurotoxine extraite de la variante « S »
neurotoxine extraite de la variante « R »

Pour l'immunisation, nous nous sommes servis de lapins de 2.500 g.

1. *Bacille typhi murium* « S ». Injection 2 fois par semaine: 5 injections intrapéritonéales de 0,5 ml, dilution 1/10.000, 1/10.000, 1/5.000, 1/5.000, 1/5.000. Les dilutions sont faites à partir d'un tube de culture de 24 heures récoltée dans 10 ml sérum physiologique, les suspensions étant inactivées 1 heure à 56°. Injection intraveineuse 0,5 ml dilution 1/5.000. Cinq jours après cette dernière injection, saignée d'épreuve. Des trois lapins utilisés, un seul a présenté un titre agglutinant 1/3.200. On a poursuivi les inoculations avec trois nouvelles injections intraveineuses en dilution 1/500; les titres agglutinants atteignant 1/6.400, les animaux ont été saignés à blanc.

2. *Endotoxine* « O ». Solution 1 mg/ml. Injection intrapéritonéale deux fois par semaine des dilutions suivantes: 1/1.000; 1/500; 1/200; 1/200, injection intraveineuse 1/500; 1/100. Après 5 jours — saignée, titre agglutinant pour le bacille *typhi murium* « S »: 1/8.000.

3. *Neurotoxine* « S ». Solution ayant 2 mg N/ml. Injection intrapéritonéale, deux fois par semaine, avec les dilutions suivantes: 0,02 mg N; 0,1 mg N; 0,15 mg N; 0,30 mg N. Injection intraveineuse: 0,30 mg N; 0,50 mg N. Saignée d'épreuve, titre agglutinant avec bacille *typhi murium* « S »: 1/3.200. Une hyperimmunisation par trois injections intraveineuses de 0,5 mg N n'a pas changé le titre.

4. *Bacille typhi murium* « R ». Le même schéma d'immunisation que pour la variante « S ». Finalement, la saignée d'épreuve a donné un titre agglutinant avec les germes homologues de 1/500. Après 5 autres injections intraveineuses avec les dilutions 1/1.000, 1/500, 1/250, 1/250, 1/250, nous avons obtenu un titre agglutinant de 1/2.500.

5. *Neurotoxine* « R ». Solution ayant 3 mg N par ml. Injection intrapéritonéale deux fois par semaine avec les dilutions suivantes: 0,03 mg N; 0,06 mg N; 0,1 mg N et 0,15 mg N. Injection intraveineuse toujours deux fois par semaine: 0,15 mg N; 0,30 mg N; 0,30 mg N et 0,50 mg N. Cinq jours après la dernière injection, saignée d'épreuve, titre agglutinant 1/250 pour le bacille *typhi murium* « R » vivant. On a hyperimmunisé trois fois les lapins avec des doses correspondant à 0,5 mg N. Saignée d'épreuve. Deux lapins avaient un titre agglutinant de 1/1.500 et le troisième 1/700. On a saigné un des lapins au titre le plus élevé. Il faut spécifier que continuant l'hyperimmunisation des deux lapins restants, avec trois autres injections de 0,5 mg N, le titre n'a plus varié.

Dans le tableau I sont figurés les résultats des agglutinations homologues et hétérologues avec les sérums qui ont servi dans nos expériences.

Tableau I

Titres agglutinants des sérums antimicrobiens (« S » et « R »), antineurotoxines (« S » et « R ») et antiendotoxine (« O »)

Sérum anti:	Culture de 18 heures	
	Typhi murium « S »	Typhi murium « R »
Typhi murium « S »	1/6.400	0
Typhi murium « R »	1/50	1/2.500
Endotoxine « O »	1/8.000	1/50
Neurotoxine « S »	1/3.200	1/50
Neurotoxine « R »	0	1/1.500

Avec les mêmes sérums, nous avons pratiqué des réactions de précipitation avec les neurotoxines « S » et « R » et avec l'endotoxine « O ». La technique a été la suivante: les dilutions des antigènes (0,3 ml) ont été mises en contact avec du sérum non-dilué (0,3 ml). Après 2 heures de contact à 37°, on observe l'apparition d'un anneau de précipitation à l'interface des deux solutions; le titre marqué correspond à la plus grande dilution d'antigène capable de donner une précipitation avec le sérum non-dilué.

Tableau II

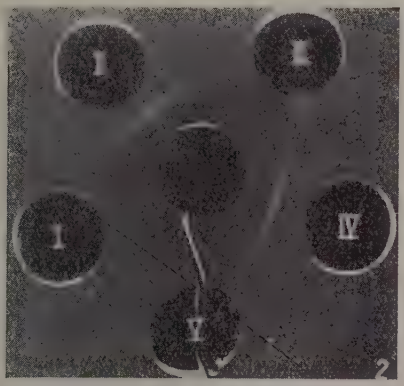
Titres précipitans des sérums antimicrobiens (« S » et « R »), antineurotoxines (« S » et « R ») et antiendotoxine (« O »)

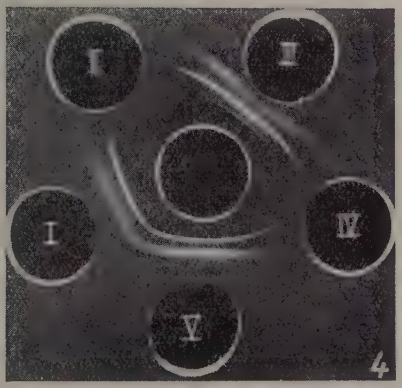
Antigènes	Neurotoxine « S »	Neurotoxine « R »	Endotoxine « O »
Sérum anti-Typhi murium « S »	1/2.500	1/2	1/1.600
Sérum anti-Typhi murium « R »	1/2	1/1.600	0
Sérum antiendotoxine « O»	1/1.600	1/2	1/2.500
Sérum antineurotoxine « S »	1/600	1/5	1/1.000
Sérum antineurotoxine « R »	1/4	1/600	0

Réaction de précipitation en gel d'agar. Les résultats de ces expériences réalisées par la technique d'Ouchterlony sont rapportés dans les Photos. 1 — 5.

Les antigènes utilisés sont placés dans les godets du centre et les antisérums dans les godets latéraux. Les antisérums employés furent les suivants:

I. antisérum microbien « S » (*typhi murium* var. « S »)
II. antisérum microbien « R » (*typhi murium* var. « R »)
III. antisérum neurotoxine « S »
IV. antisérum neurotoxine « R »
V. antisérum endotoxine « O »





Photographie 1. — Suspension de bacilles *typhi murium* « S » inactivée.

Photographie 2. — Suspension de bacilles *typhi murium* « R » inactivée.

Photographie 3. — Endotoxine « O » — solution 1 mg/ml.

Photographie 4. — Solution de neurotoxine « S » — 2 mg/ml.

Photographie 5. — Solution de neurotoxine « R » 3 mgr/ml.

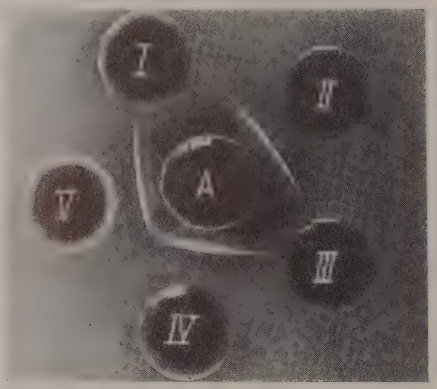
Légende des photos 1 — 5.

I. — Sérum anti-microbien « S; » *II.* — Sérum antimicrobien « R; » *III.* — Sérum anti-neurotoxine « S »; *IV.* — Sérum anti-neurotoxine « R ». *V.* — Sérum anti-endotoxine « O ».

Les résultats de ces expériences confirment ceux obtenus dans les tests d'agglutination et de précipitation, à savoir:

— les suspensions des bacilles *typhi murium* « S » inactivées 1 heure à 56° donnent des réactions de précipitation en gel avec les sérums: antimicrobien « S », antiendotoxine « O » et antineurotoxine « S » et ne donnent pas de réctions positives avec les sérums antimicrobiens « R » et les antineurotoxines « R » (Photo 1).

— Les suspensions des bacilles *typhi murium* « R » inactivées donnent des lignes de précipitation seulement avec les sérums antimicrobiens « R » et antineurotoxine « R ». Les lignes de précipitation, dans ce dernier cas, sont moins intenses et moins nombreuses que dans les tests pratiqués avec la variante smooth. Ces faits indiquent, d'une part, une complexité antigénique plus grande pour la variante «S», en comparaison avec la variante «R» et d'autre part, la faible intensité des lignes obtenues pour cette dernière variante, démontrant que tant les microbes « R » que la neurotoxine « R » sont des antigènes faibles (Photo. 2).



Photographie 6. — A. Sérum antineurotoxine « S ».

I. Polysaccharide obtenu par une hydrolyse acide de 2 h à 100°. Hydrolyse incomplète; on remarque la persistance d'une faible ligne de précipitation; II. Endotoxine « O »; *III.* Polysaccharide obtenu par une hydrolyse de 4 h en milieu acide. Le polysaccharide spécifique ne précipite plus avec le sérum antineurotoxine « S »; *IV.* et *V.* 2 récoltes différentes de neurotoxine « S », ayant 2 mg N/ml.

— L'endotoxine « O » donne des réactions positives et très intenses avec les sérums antimicrobiens « S », antiendotoxine « O » et antineurotoxine « S » (Photo. 3). Cette constatation implique deux conclusions possibles, notamment que la neurotoxine « S » entre dans la constitution du complexe de l'endotoxine «O», ainsi que Grabar et Gallut, (9, 10) d'une part, et Boroff (6, 7) d'autre part, l'ont préconisé respectivement pour la toxine protéique du vibrion et pour la neurotoxine de *Shiga* « S », ou qu'il existe un « motif » antigénique spécifique commun dans la protéine de l'endotoxine « O » et dans la neurotoxine « S ».

Au cours de cet exposé nous allons revenir sur ce point.

Il apparaît nettement que du point de vue spécificité, la neurotoxine « S » n'a aucune relation sérologique avec la neurotoxine « R », cette constatation étant valable non seulement pour le bacille *typhi murium*, mais aussi pour le bacille de *Shiga*. Le fait qu'il existe deux neurotoxines *Shiga* du point de vue spécificité sérologique, l'une dérivant de la forme « R » et l'autre de la forme « S », nécessite la révision de nos conceptions concernant les neurotoxines de ce germe, ce qui fera l'objet d'un prochain mémoire.

— Dans la Photo. 4, on observe les lignes de précipitation de la neurotoxine « S » de *typhi murium* avec le sérum homologue et aussi avec les sérums antimicrobiens « S » et antiendotoxine « O »; par contre, il n'y a aucune réaction avec les sérums anti-*typhi murium* « R » et antineurotoxine « R ».

— Dans la Photo. 5 sont confirmés les résultats antérieurs; la solution de neurotoxine « R » ne précipite qu'avec les sérums: antimicrobien « R » et anti-neurotoxine « R ».

— Dans la Photo. 6, le sérum antineurotoxine « S » a été mis en contact avec deux préparations de polysaccharide spécifique, obtenues par clivage acide de l'endotoxine « O ». On observe que l'une d'entre elles (No. I) n'est pas complètement hydrolysée (2^h à 100°) et continue à donner une faible ligne de précipitation commune à l'une des lignes de l'endotoxine « O », tandis que le polysaccharide obtenu après 4 heures d'hydrolyse acide de l'endotoxine « O », ne précipite plus avec le sérum antineurotoxine « S ».

On a pratiqué aussi des réactions en gel d'agar entre la neurotoxine « S » du b. *typhi murium* et les sérums: anti-typhique « O » (agglutinines somatiques IX, XII — titre agglutinant: 1/3.200) et le sérum para B « O » (agglutinines somatiques IV, V, XII — titre agglutinant: 1/1.200) avec des résultats négatifs. Ce fait démontre que les facteurs spécifiques communs des *Salmonella* se trouvent situés sans l'haptène polysaccharidique de l'endotoxine « O ».

Les réactions en gel d'agar entre le lipopolysaccharide préparé selon la méthode de Westphal ou de Morgan et le sérum antineurotoxine « S » sont négatives, fait normal vu que ces préparations sont dépourvues de protéines.

En conclusion, il ressort de cette série d'expériences que la neurotoxine « R », malgré sa faible antigénéicité, est différente du point de vue spécificité de la neurotoxine « S », bien que, comme il sera montré plus loin, du point de vue action sur l'animal, elle déclenche les mêmes symptômes. Cette constatation est similaire, en quelque sorte, à celle faite pour les endotoxines « O », qui sont sérologiquement différentes d'une espèce à l'autre, mais identiques quant à leurs manifestations sur l'animal.

Dans le cas des neurotoxines, nous constatons non seulement qu'elles diffèrent sérologiquement d'une espèce à l'autre, mais aussi que, dans le cadre de la même espèce, elles sont différentes selon la variante « S » ou « R » considérée.

SUR LA COEXISTENCE DANS LES AUTOLYSATS DE LA VARIANTE « S » DU TYPHI MURIUM DE LA NEUROTOYINE « S » ET DE L'ENDOTOXINE « O »

Dans une série de recherches, nous nous sommes proposé d'étudier si dans les autolysats chloroformiques de *typhi murium* « S » on trouve de l'endotoxine « O » en même temps que la neurotoxine « S » et la variation comparative du point de vue quantitatif de ces deux toxines, en fonction du temps d'autolyse.

En vue de ces recherches, une suspension de germes vivants de 18 heures, en concentration de 50 mg poids sec/ml a été soumise à l'autolyse en présence du chloroforme et des prises ont été effectuées le 3-e, 5-e et 8-e jour. Après séparation de la neurotoxine « S » par précipitation au point iso-électrique, le surnageant clair, dans lequel on recherche l'endotoxine acido-soluble, est soumis à la dialyse. Sur cette solution on a pratiqué le dosage du N total et après l'hydrolyse les dosages des substances réductrices et des lipides. De même, on a effectué le test de toxicité sur des souris de 18 g.

Les résultats obtenus sont figurés dans le tableau III, en comparaison avec une préparation d'endotoxine « O », obtenue par extraction avec de l'acide trichloracétique des mêmes germes, selon la méthode de Boivin et Mesrobeanu

(2, 3, 16). On constate également qu'après dialyse les solutions sont opalescentes et que l'intensité de cette opalescence diminue avec le temps d'autolyse, de même que la quantité du précipité obtenu par addition de trois volumes d'acétone.

Tableau III

Variation de l'endotoxine « O » en fonction du temps d'autolyse

	Temps d'autolyse, en jours			Témoin endotoxine extraite par la méthode Boivin Mesrobeanu (16)
	3	5	8	
Rendement en % microb. sec.	7,8	5,5	3,4	5,3
Toxicité pour la souris en mg inocul. i.p.	0,05	0,07	0,07	0,05
Acides gras en % extr. sec	20,2	19,7	18,8	21,4
Subst. réductr. en % extr. sec	39,4	33,4	31,8	39,8
N total en % extr. sec	2,9	2,5	1,9	2,4

Il ressort nettement de ce tableau que dans le surnageant de l'autolysat, après la précipitation de la toxine protéique, il reste de l'endotoxine « O » en quantité notable. Si l'on considère les résultats obtenus en fonction du temps d'autolyse, on constate que le rendement en endotoxine « O » diminue au fur et à mesure que le temps se prolonge, ainsi qu'une variation de pourcentage de ses différentes composantes.

On constate ainsi une diminution des substances réductrices et du N total, tandis que le taux d'acides gras semble ne pas varier d'une manière consistente.

Malgré la variation quantitative plus importante des substances réductrices le huitième jour, les qualités biologiques et physiques de cette préparation n'ont pas changé (toxicité, thermolabilité, antigénéicité).

Dans la même série d'expériences, nous avons analysé le rendement, la constitution et la toxicité de la neurotoxine « S », en fonction du temps d'autolyse. Les résultats sont rapportés dans le tableau IV.

Tableau IV

Variation de la neurotoxine « S » en fonction du temps d'autolyse.

Temps d'autolyse en jours	3	5	8
Rendement en % microb. sec	2,94	2,16	1,98
Toxicité pour la souris en mg N inoc. i.p.	0,006	0,006	0,007
Acides gras en % extrait sec	22	18,5	17,50
Subst. réduct. en % extr. sec	2,7	1,2	0,7
N total en % extrait sec	12,50	10,28	9,80

Le rendement en neurotoxine « S » comme celui de l'endotoxine « O » diminue par prolongement du temps d'autolyse, tandis que la toxicité par rapport à la concentration en N ne varie pas. Le faible pouvoir réducteur constaté après l'hydrolyse du produit dans le précipité isolé de l'autolysat de 3 jours diminue considérablement, à mesure que l'autolyse avance. Le taux des acides gras et du N total, diminue également. Ces expériences démontrent de même que les conclusions de BOROFF selon lesquelles la neurotoxine « S » est issue de l'endotoxine « O » en voie d'autolyse, ne sont pas confirmées. En effet, dans cette éventualité on aurait du trouver au fur et à mesure de la diminution de l'endotoxine « O » une augmentation de la neurotoxine « S ».

Dans une autre série d'expériences nous avons reproduit les résultats de BOIVIN, DELAUNAY et SARCIRON (5) obtenus par le chauffage des bac. *Shiga*. Une suspension de bacilles *typhi murium* « S » 50 mg. poids sec/ml. pH 7, a été chauffée 1 heure à 56°. Dans le surnageant de cette suspension ón a isolé la neurotoxine par précipitation à pH 3,5. Dissoute et inoculée aux souris elle était capable de tuer l'animal. On a calculé qu'environ 20% de la toxicité obtenue par autolyse était retrouvée dans le surnageant. La même toxine chauffée 30′ à 100° ne tuait plus la souris — avec 1 mg. N par voie intra-péritonéale.

En conclusion, dans les autolysats des bacilles *typhi murium* « S » la neurotoxine « S » et l'endotoxine « O » cœxistent, quel que soit le temps d'autolyse. Cette constatation démontrant que les neurotoxines « S » de *typhi murium* ont une individualité chimique définie dans la cellule microbienne, et en dehors de l'endotoxine « O », est du reste aussi confirmée par leur présence dans les variantes « R », qui sont dépourvues d'endotoxine « O ».

EXPÉRIENCES D'ÉPUISEMENT DU SÉRUM ANTIENDOTOXINE «O» PAR LA NEUROTOXINE «S» ET PAR LE POLYSACCHARIDE SPÉCIFIQUE

Le sérum antiendotoxine « O » (titre agglutinant 1/3.200) précipitant tant avec le complexe glucido-lipido-polypeptidique qu'avec la neurotoxine « S » a été utilisé dans une série d'expériences pour préciser s'il contient un seul anticorps avec deux récepteurs — un pour le polysaccharide spécifique et un autre pour la neurotoxine « S » — ou s'il existe deux anticorps indépendants.

En vue de cette expérience, trois échantillons du sérum antiendotoxine « O » ont été épuisés comme suit:

— un échantillon épuisé avec de la neurotoxine « S »

— un échantillon épuisé avec du polysaccharide spécifique

— un échantillon épuisé successivement avec de la neurotoxine « S » et du polysaccharide spécifique.

A cette fin, nous avons mélangé 2 ml sérum antiendotoxine « O » avec 0,5 ml solution neurotoxine « S » à concentration 2 mg N/ml. Après 24 heures à 37°, centrifugation. Constatant une légère précipitation avec la neurotoxine « S » (réaction dans le tube) nous avons ajouté encore 0,2 ml solution neurotoxine « S ». Après un nouvel séjour de 5 heures à 37°, le sérum est à nouveau soumis à une centrifugation et le surnageant utilisé dans le test d'OUCHTERLONY.

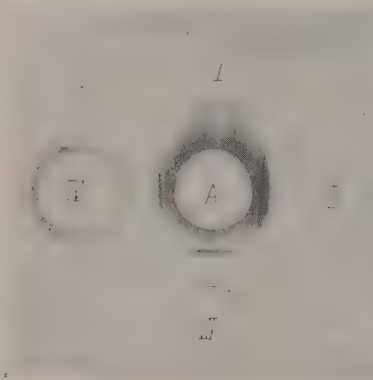
Pour la saturation avec le polysaccharide (Fig. 6 préparation No. III) nous avons employé une solution contenant 2 mg polysaccharide par ml sérum physiologique. Pour 2 ml sérum anti — nous avons utilisé 0,5 ml de cette solution

en une seule fois, laissant en contact 24 heures à 37°. Après ce laps de temps, le sérum ne donnait plus de précipitation en tube avec le polysaccharide.

Les sérums épuisés ont été mis en contact dans le test d'OUCHTERLONY avec les antigènes suivants:

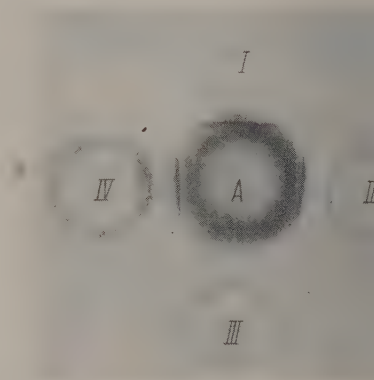
I. Neurotoxine « S » II. Endotoxine « O » III. Polysaccharide spécifique IV. Microbes vivants *typhi murium* « S ».

Dans la photo 7, on voit que le sérum antiendotoxine « O » épuisé par la neurotoxine « S » ne donne plus de réactions en gel d'agar avec cette toxine protéique, comme preuve que l'épuisement était complet. Ce sérum néanmoins continue de précipiter avec l'endotoxine « O », avec le polysaccharide spécifique et avec les germes vivants.



Photographie 7. — A. Sérum antiendotoxine « O » épuisé avec de la neurotoxine « S ». (Les plaques ont été séchées et coloriées avec azocarmine B.)

I. Neurotoxine « S »; *II.* Endotoxine « O »; *III.* Polysaccharide obtenu par l'hydrolyse de l'endotoxine; *IV.* Suspension microbes, *typhi-murium* « S ».



Photographie 8. — A. Sérum antiendotoxine « O » épuisé par l'haptène polysaccharidique. (Les plaques ont été sechées et coloriées avec azocarmine B).

I. Neurotoxine « S »; *II.* Endotoxine « O »; *III.* Polysaccharide obtenu par l'hydrolyse de l'endotoxine. *IV.* Suspension microbes, *typhi-murium* « S ».

Dans la photo 8 il est démontré que le sérum antiendotoxine « O » épuisé par le polysaccharide spécifique ne précipite plus avec ce haptène, mais continue à donner des réactions positives avec la neurotoxine « S », l'endotoxine « O » et les germes vivants.

Enfin, l'échantillon du sérum antiendotoxine « O » épuisé successivement avec la neurotoxine « S » et le polysaccharide ne précipite plus avec aucun des antigènes utilisés dans cette expérimentation, microbes y compris.

Il ressort de cette expérience que le complexe d'endotoxine « O » extrait des germes par l'acide trichloracétique engendre chez le lapin des anticorps distincts, tant pour la neurotoxine « S » que pour le polysaccharide spécifique et que ces anticorps peuvent être individualisés par la technique de saturation. Mais, tandis que le polysaccharide, pour engendrer des anticorps doit faire partie du complexe de l'endotoxine « O », la fraction protéique (lipoprotéique) est à elle seule antigènique.

La constatation que l'endotoxine « O » est capable d'engendrer un anticorps distinct pour la neurotoxine « S » plaide en faveur de la conception selon laquelle une fraction de la neurotoxine « S » serait engagée dans la formation du complexe glucido-lipido-polypeptidique, ou qu'il existerait un « motif » antigénique commun entre cette protéine et celle de l'endotoxine.

CONSTITUTION ET PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES NEUROTOXINES « S » ET « R » DU BACILLE TYPHI MURIUM

Comme remarque générale, les surnageants des autolysats des bacilles « S » précipitent moins abondamment que ceux des variantes « R » à pH 3,5 par l'acide trichloracétique, mais sont plus toxiques par rapport à leur poids d'azote.

Les analyses ont révélé que ces neurotoxines sont des lipoprotéines contenant aussi de petites quantités de substances réductrices.

Analysant parallèlement une neurotoxine *Shiga* « S » et une autre *Shiga* « R » préparées par la même technique, nous avons constaté qu'elles renferment également, des quantités du même ordre de substances lipidiques et réductrices.

La composition des neurotoxines de *typhi murium* en N total, en acides gras et en substances réductrices est rapportée dans le tableau V.

Tableau V

Composition chimique des neurotoxines « S » et « R » de typhi murium

	Rendement en % microb. secs	en % du poids sec		
		Acides gras	N. total	Subst. réduct.
Neurotoxine « S »	2,94	22,0	12,5	2,7
Neurotoxine « R »	5,05	33,4	12,6	4,1

Par épuisement direct avec de l'éther, les neurotoxines cèdent seulement des traces d'acides gras et par épuisement avec du chloroforme- alcool métilique (2: 1) on obtient 5 à 10% de la quantité totale d'acides gras. Il ressort que les lipides sont fermement liés aux protéines toxiques, ce qui correspond au lipoïde « A » de WESTPHAL et coll. (19, 20) décrit dans l'endotoxine « O ».

En vue d'établir si les neurotoxines des variantes « S » font partie du complexe d'endotoxines « O », ainsi qu'il apparaît du point de vue sérologique, nous avons essayé d'obtenir une protéine toxique par clivage chimique de l'endotoxine « O ».

Dans ce but, 500 mg d'endotoxine « O » — *typhi murium* — est hydrolysée dans de l'acide acétique 1% pendant 2 heures à 100°. Le précipité formé est recueilli par centrifugation, lavé à l'acide acétique 1% et redissous dans 10 ml d'une solution légèrement alcaline.

Le produit inoculé chez la souris — 0,5 mgN/ml par voie i.p. — n'a pas tué l'animal; donc le clivage de l'endotoxine dans ces conditions de travail abolit la toxicité de la fraction protéique. Les réactions en gel d'agar avec le sérum

antineurotoxine « s » donnent une très faible ligne de précipitation, contrairement à la neurotoxine « s » extraite par autolyse microbienne.

On a essayé de même, la technique préconisée par Goebel et coll. (11) pour la préparation de la protéine toxique à partir de l'endotoxine du bacille de *Flexner*. — 500 mg. d'endotoxine *typhi murium* sont dissous dans 30 ml de solution d'acide picrique saturée et hydrolysée dans un bain à 100° durant 45 minutes, quand le picrate de protéine devient insoluble. Centrifugation, lavage avec de l'acétone acidifiée, dissolution dans des solutions faiblement alcalines, reprécipitation au point isoélectrique et dialyse. Cette solution n'est plus toxique par voie intrapéritonéale chez la souris et, comme dans le premier cas, elle précipite très faiblement avec le sérum neurotoxique « s » en gel d'agar.

Par conséquent, nous n'avons pas réussi à préparer par ces deux techniques une protéine toxique à partir de l'endotoxine « o », à cause de l'extrême labilité de ces toxines à la température et à l'action des acides.

Des substances toxiques, ayant le même caractère chimique et biologique, ont été extraites à partir des germes vivants *typhi murium* aussi par d'autres méthodes d'autolyse et par précipitation avec de l'acide trichloracétique au point isoélectrique. Dans le chapitre concernant les techniques utilisées nous les avons décrites. Ainsi, en faisant une autolyse de 3 jours des germes en présence du désoxycholate de soude, du tampon barbiturate et du tampon phosphate et en précipitant la neurotoxine par l'acide trichloracétique dans le surnageant clarifié par centrifugation, nous avons obtenu des rendements en lipoprotéines se situant entre 1,50 — 2,80% des microbes secs et possédant la même constitution chimique que les neurotoxines obtenues par autolyse chloroformique, à savoir: environ 13% N total, 20% acides gras et 3% substances réductrices. Etant donné que du point de vue action sur la souris ces produits ne se sont pas révélés plus toxiques que les neurotoxines préparées par notre technique, nous nous sommes limités dans nos expériences à l'autolyse par le chloroforme.

En ce qui concerne les neurotoxines préparées par la méthode de van Heyningen, nous avons obtenu des produits à constitution quantitativement différente par comparaison aux nôtres. L'application rigoureuse de cette technique ne nous a pas permis de dépasser le premier stade de purification par le fait que nos produits ne sont pas devenus insolubles par dialyse, ce qui, par contre, a donné à cet auteur la possibilité d'une purification ultérieure de la neurotoxine de *Shiga*. Dans le tableau VI, nous avons consigné ces résultats comparativement à la neurotoxine « s » préparée par notre méthode.

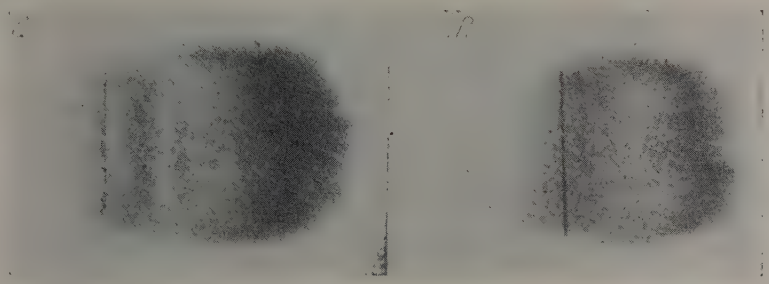
Tableau VI

Neurotoxines de Typhi murium préparées selon les méthodes de van Heyningen et de Boivin et Mesrobeanu

Méthode	Rendeament % microb. secs.	en % du poids sec		
		Acides gras	N total	Subst. réductr.
Neurotoxine « S » (Boivin-Mesrobeanu)	2,94	22,00	12,50	2,7
Neurotoxine « S » (van Heyningen)	0,80	4,50	14,20	6,1
Neurotoxine « R » (van Heyningen)	1,40	5,80	13,08	7,2

Les rendements plus faibles obtenus par la méthode de van HEYNINGEN sont dus, très probablement, au fait que nous n'avons pratiqué qu'une seule extraction par le KOH, cet auteur recommandant deux extractions successives.

On constate de ce tableau, que par cette méthode on obtient des toxines ayant environ quatre fois moins d'acides gras que dans nos préparations. De même, la quantité des substances réductrices est plus importante que dans



Photographie 9. — L'électrophorèse des neurotoxines « S » et « R » de *Typhi murium*.

es neurotoxines extraites par les autolyses chloroformiques. Van HEYNINGEN, trouve chez la neurotoxine de *Shiga* « R », dans le même stade de purification, trois fractions.

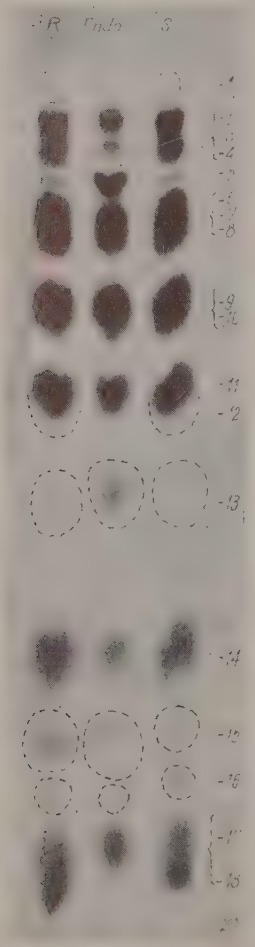
L'électrophorèse sur papier relève dans nos préparations des neurotoxines « S » et « R » de *typhi murium*, trois fractions protéiques, comme il résulte de la photo 9. L'électrophorèse a été réalisée dans du tampon acétate pH 5,6; f.i. = 0,1; 0,2 mA/cm; temps 18 heures; coloration au bleu de bromphénol.

Pour l'étude des amino-acides, qui entrent dans la constitution des neurotoxines « S » et « R », ainsi que dans l'endotoxine « O », on a hydrolysé ces produits microbiens dans de l'acide chlorhydrique 6 N, 24 heures à 100° et on a dilué les solutions hydrolysées pour avoir 2 mg N/ml. Chromatographie sur papier Whatman No. 1, irrigation avec butanol/acide acétique/eau (11:3:11). Pour le développement nous avons utilisé le réactif suivant, qui nous a donné satisfaction par la gamme très variée des couleurs obtenues: 1 g% ninhydrine en butanol avec 50% chloroforme et 3% colidine. Par irrigations répétées ou prolongées, nous avons pu mettre en évidence dans les neurotoxines « S » et « R » 17 amino-acides et de la glucosamine. On remarque dans la photo 10 (irrigation une seule fois pendant trois jours) la similitude entre la constitution en amino-acides des protéines toxiques « S » et « R » malgré leurs différences sérologiques.

On peut constater, de même, la différence entre ces protéines et celle fournie par l'hydrolyse de l'endotoxine « O ». Dans le chromatogramme de cette dernière on remarque une forte concentration de glucosamine qui pourrait provenir du polysaccharide spécifique et l'absence de l'oxyproline et de la leucine. L'oxyproline, donnant une tâche jaune clair avec notre réactif de développement, n'est pas visible dans la photo. En ce qui concerne la leucine, elle est apparue dans les neurotoxines « S » et « R » avec netteté en surchargeant le spot de départ et en irrigant une seule fois en 48 heures. On remarque de même son absence dans

l'endotoxine « O » (photo 11). Le groupe cystéine, histidine et lysine et le groupe acide aspartique, arginine, glycocolle sont apparus nettement dans les chromatogrammes irrigués une seule fois pendant 3 jours. Ces amino-acides se différenciaient avec le réactif décrit par la variété de leur couleur et furent identifiés par des témoins.

En conclusion, la chromatographie uni-dimensionnelle relève entre la toxine « S » et « R » une similitude nette dans la composition en aminoacides, malgré la différence sérologique qui existe entre ces deux protéines et par contre, il existe certaines différences entre la composition en amino-acides de la neurotoxine « S » et de la protéine de l'endotoxine «O», malgré leur similitude sérologique.



Photographie 10

Action de la chaleur sur les neurotoxines de typhi murium. Un autre caractère qui différencie nettement les neurotoxines de l'endotoxine « O » est leur comportement vis-à-vis de la chaleur.

L'endotoxine « O » *est thermostable* en solution neutre; on peut l'autoclaver 1 heure à 120° sans altérer ses qualités biologiques et physico-chimiques.

Les neurotoxines sont thermolabiles; par chauffage de 30 minutes à 60°, elles perdent leur toxicité et à 100° deviennent opalescentes, sans précipiter.

Action du formol sur les neurotoxines de typhi murium. Tandis que les endotoxines ne peuvent être transformées en anatoxines par l'action du formol, les neurotoxines de *typhi murium*, pareillement aux neurotoxines de *Shiga*, sont détoxifiées par l'action du formol.

Nous avons expérimenté avec:

— une toxine protéique « S », conc. 2,15 mg N/ml, qui tue la souris par voie i.p. jusqu'à la concentration de 0,006 mg N.

Photographie 11

Photographies 10 et 11. — Les chromatogrammes des neurotoxines « S » et « R » de *Typhi murium* en comparaison avec le chromatogramme de la protéine de l'endotoxine « O ».

1. Ac. α diaminopimélique; 2. Cystéine; 3. Histidine; 4. Lysine; 5. Glucosamine; 6. Ac. aspartique; 7. Arginine; 8. Glycocolle; 9. Sérine; 10. Thréonine; 11. Ac. glutamique; 12. Oxyproline; 13. Alanine; 14. Pyrosine; 15. Valine; 16. Norvaline; 17. Phenylalnine; 18. Leucine.

— une toxine protéique « R », conc. 3,25 mg N/ml, qui tue la souris par voie i.p. jusqu'à la concentration 0,02 mg N.

Ces deux neurotoxines ont été traitées avec 0,5 ml formol pour 100 ml toxine et abandonnées 15 jours à 37°. Après ce laps de temps, les solutions sont restées claires; inoculées aux souris par voie i.p. nous avons constaté que la toxine « S » tuait l'animal avec 0,22 mg N et celle « R » avec 0,33 mg N. Cette toxicité résiduelle a été encore diminuée en ajoutant 0,3 ml formol pour 100 ml toxine (donc en tout 0,8 ml%). Après 12 jours à 37° la neurotoxine « S » tuait la souris seulement dans la concentration de 1,07 mg N et celle « R » à 1,62 mg N.

Photographie 12. — Souris avec parèse du train postérieur; inoculée avec 0,0006 mg N de neurotoxine « S » de typhi murium.

Les réactions de précipitation en gel d'agar, montrent que la transformation en toxoïde se fait sans aucune altération de la spécificité. De même, les lapins immunisés avec l'anatoxine protéique « S » ont produit des anticorps, démontrant par ce fait le maintien de l'antigénéicité .

Acido-labilité des neurotoxines. En épuisant en endotoxine « O » les cellules bactériennes par des traitements répétés avec de l'acide trichloracétique, nous avons constaté qu'après la 6-e extraction, le liquide ne contenait plus de l'endotoxine « O » (pas de précipitation par 4 volumes acétone, pas de précipitation spécifique avec un sérum antiendotoxine « O »).

Les cadavres microbiens ont été suspendus dans du tampon pH 7,4 et soumis à l'autolyse chloroformique pendant 3 jours. Dans le surnageant nous avons précipité une protéine à pH 3,5, mais nous avons constaté qu'elle était partiellement soluble dans les solutions légèrement alcalines et qu'elle ne tuait plus les souris.

TOXICITÉ DES NEUROTOXINES « S » ET »R» DE TYPHI MURIUM

Action sur les souris. Des souris de 16—18 g ont été inoculées avec ces toxines en diverses concentrations, tant par voie intrapéritonéale que par voie intraveineuse.

Nous avons constaté que surtout par inoculation intraveineuse et pour des doses qui tuaient l'animal en 4—5 jours, certaines souris présentaient des phénomènes de parèse du train postérieur, similaires à ceux obtenus par l'inoculation de la neurotoxine de *Shiga.* Les souris présentent des difficultés respiratoires

et pour les doses fortes, de la diarrhée et quelque fois des convulsions avant la mort.

Dans la photo 12 on peut voir une souris en état de coma, 4 jours après l'inoculation i. v. de la neurotoxine « S », en concentration de 0,0006 mg N dans laquelle la parèse du train postérieur est bien visible.

L'inoculation des neurotoxines par voie intrapéritonéale chez les souris provoque la mort, dans des concentrations plus fortes en comparaison avec l'inoculation intraveineuse. De même, il faut spécifier que tant par voie intrapéritonéale que par voie intraveineuse, la neurotoxine « S » est plus toxique que celle de la variante « R » si l'on rapporte les résultats de l'inoculum à la même concentration d'azote.

Dans le tableau VII sont figurés les résultats obtenus par une de nos préparations de neurotoxine « S » et une autre de neurotoxine « R » inoculées tant par voie intraveineuse que par voie intrapéritonéale.

Tableau VII

Toxicité de la neurotoxine « S » et « R » de typhi murium par voie intraveineuse

Conc. en mg. N neurotoxine «S»	0,01	0,005	0,0025	0,00125	0,0006	0,0003	0,00015
Nombre souris mortes / Nombre souris inoculées	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	2/3	1/3
Conc. en mg N neurotoxine « R »	0,01	0,005	0,0025	0,00125	0,0006	0,0003	
Nombre souris mortes / Nombre souris inoculées	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	0/3	

Toxicité de la neurotoxine « S » et « R » de typhi murium par voie intrapéritonéale

Conc. en mg N neurotoxine «S»	0,056	0,028	0,014	0,007	0,0035
Nombre souris mortes / Nombre souris inoculées	3/3	3/3	2/3	2/3	0/3
Conc. en mg N neurotoxine « R »	0,08	0,04	0,02	0,01	
Nombre souris mortes / Nombre souris inoculées	3/3	2/3	1/3	0/3	

Totalisant quelques expériences faites pour le titrage de plusieurs récoltes de toxines « S » et « R », nous avons pu calculer la DLM_{50} d'après Reed et Muench pour l'inoculation intrapéritonéale

Tableau VIII

DLM_{50} pour la neurotoxine « S » par voie intrapéritonéale

Quantité de toxine en mg. N inoc. dans 0,5 ml.	Souris			Résultats cumulatifs		
	inoc.	mortes	survivantes	décès	survivantes	pourcentage morts
0,22	15	15	0	77	0	100
0,11	15	14	1	62	28	69
0,055	15	14	1	48	27	64
0,027	15	13	2	34	26	57
0,014	15	14	1	21	24	47 DLM_{50}
0,007	15	6	9	7	23	23
0,0035	15	1	14	1	14	7
Total	105	77	28			

DLM_{50} pour la neurotoxine « R » par voie intrapéritoneale

0,32	21	21	0	82	0	100
0,16	21	20	1	61	23	73
0,08	21	19	2	41	22	65
0,04	21	16	5	22	20	52 DLM_{50}
0,02	21	6	15	6	15	29
Total	105	82	23			

A la lecture de ce tableau, on constate que la DLM_{50} pour la neurotoxine « S » est d'environ 0,014 mg N et pour la neurotoxine « R » de 0,04 mg N; donc il faut environ trois fois plus de neurotoxine « R » pour tuer 50% des souris par comparaison à la neurotoxine « S ».

En faisant le titrage d'une préparation de toxine protéique « S » et d'une autre « R », préparées selon la technique de van HEYNINGEN (premier stade de purification), nous avons obtenu pour l'inoculation intraveineuse les résultats suivants:

Tableau IX

Toxicité par voie intraveineuse des neurotoxines « S » et « R » de typhi murium, préparées selon v. Heyningen

Conc. en mg N neurotoxine « S »	0,04	0,02	0,01	0,005	0,002
Nombre souris mortes / Nombre souris inoculées	3/3	3/3	2/3	1/3	0/3
Conc. en mg N neurotoxine « R »	0,04	0,02	0,01	—	—
Nombre souris mortes / Nombre souris inoculées	3/3	3/3	0/3	—	—

Il ressort que les neurotoxines « S » et « R », préparées selon notre méthode sont plus toxiques, pour les souris inoculées par voie intraveineuse, en tenant compte du poids d'azote, que celles préparées par la méthode de van HEYNINGEN.

Au cours de ce travail, pour notre orientation, nous avons essayé d'extraire par la même technique des substances toxiques thermolabiles d'une série de germes chez lesquels on n'a jamais décrit l'existence des neurotoxines, tels que: *b. Flexner*, *b. Sonne* « S » et « R », *b. Schmitz*, *b. Gärtner* « S » et « R » *b. Coli* « S », *b. Proteus* X_{19}, *b. pyocyanique*, *Serratia marcescens* etc.

Nous avons constaté qu'à partir de leurs autolysats chloroformiques on peut extraire des substances lipoprotéiques thermolabiles présentant une toxicité nette pour la souris, toxicité variant selon les germes entre 0,1—0,005 mg N. Nous avons pu nous rendre compte que la voie d'inoculation intraveineuse est plus sensible pour la souris que la voie intrapéritonéale. Beaucoup de souris ont présenté des phénomènes de parèse du train postérieur et des difficultés respiratoires. La diarrhée était un phénomène inconstant. La mort des souris survenait d'habitude en 4—5 jours, mais nous devons spécifier que même pour les neurotoxines de *Shiga* et de *typhi murium*, elle peut survenir le 7-e et 8-e jour. Dans ce dernier cas, les phénomènes qui accompagnent la mort sont représentés par des difficultés respiratoires et un état de prostration.

Les recherches concernant les neurotoxines d'autres germes Gram-négatifs que le *typhi murium*, sont en cours.

Action sur les lapins. Une série de lapins de 2000 g ont été inoculés par voie intravenineuse avec de la neurotoxine *typhi murium* « S ».

Pour les doses se situant entre 0,5 et 0,4 mg N par lapin, la mort des animaux survient en 4—7 heures avec une ascension thermique, (au plus 1° C), diarrhée, difficultés respiratoires et convulsions.

Les lapins ayant reçu de la toxine en concentration de 0,2—0,1 mg N sont morts en 48 et 60 heures, respectivement. Ils ont présenté de la diarrhée, une ascension thermique (38,6° à 39,3°), les premières 3 heures, après l'inoculation. La température a eu ensuite une tendance à descendre, quand la mort est survenue.

Les lots de lapins inoculés avec 0,04—0,02 mg N ont vécu 4 et 10 jours respectivement. Ces lapins ont présenté de la diarrhée et une parèse du train postérieur. La température, après une ascension thermique passagère, est tombée à 36,2° et 36,8°. Le lapin inoculé avec 0,04 mg est mort le 4-e jour, paralysé et en hypothermie, tandis que le lapin inoculé avec 0,02 mg N est mort le 10-e jour, paralysé, la température étant revenue à la normale.

Les animaux inoculés avec une concentration de toxine équivalant à 0,01 et 0,005 mg N ont survécu pendant 2 mois qund ils sont morts en état de cachexie totale (amaigrissement de 500 g).

Les lapins d'un lot inoculé avec de la neurotoxine *typhi murium* « R » en concentration de 0,02 mg N sont morts en 48 heures, tandis que les lots avec 0,01 ont survécu. Les lapins sont morts avec les mêmes phénomènes que ceux provoqués par la neurotoxine « S ».

Action sur les cobayes. Les cobayes (350 g) ont été inoculés par voie i.p. La dose mortelle est d'environ 0,1 mg N pour le neurotoxine « S ». Les cobayes sont morts en 24-72h. avec cette dose en état d'hypothermie. Pour la neurotoxine « R », la mort est provoquée par 1mg N.

Expérience de protection active. Une série de souris de 16—18 g a été vaccinée i.p. avec: l'endotoxine « O » (0,05 mg N), la neurotoxine « S » (0,0035 mg N) et la neurotoxine « R » (0,02 mg N).

Après 15 jours, ces souris ont été inoculées avec des doses mortelles d'endotoxine « O » , neurotoxines « S » et « R » et germes vivants « S » et « R ».

Les résultats obtenus, qui feront l'objet d'un autre mémoire, ont été assez nets. La neurotoxine « S » et l'endotoxine « O » protègent la souris contre l'inoculation des doses mortelles de neurotoxine « S », endotoxine « O » et germes vivants « S ».

La neurotoxine « R » protège les souris contre les germes vivants « R » et contre des doses létales de neurotoxine « R ». Néanmoins, même dans ces expériences nous avons pu nous rendre compte que la protection conférée par la neurotoxine « R » est moins forte que celle conférée par la neurotoxine « S ». Des expériences sont en cours avec la vaccination des souris par ana-neurotoxines.

DISCUSSION

La mise en évidence chez le bacille *typhi murium*, ainsi que chez d'autres germes Gram-négatifs des endoprotéines toxiques, thermolabiles, nécessitera une révision de nos conceptions concernant la structure antigénique de ces germes.

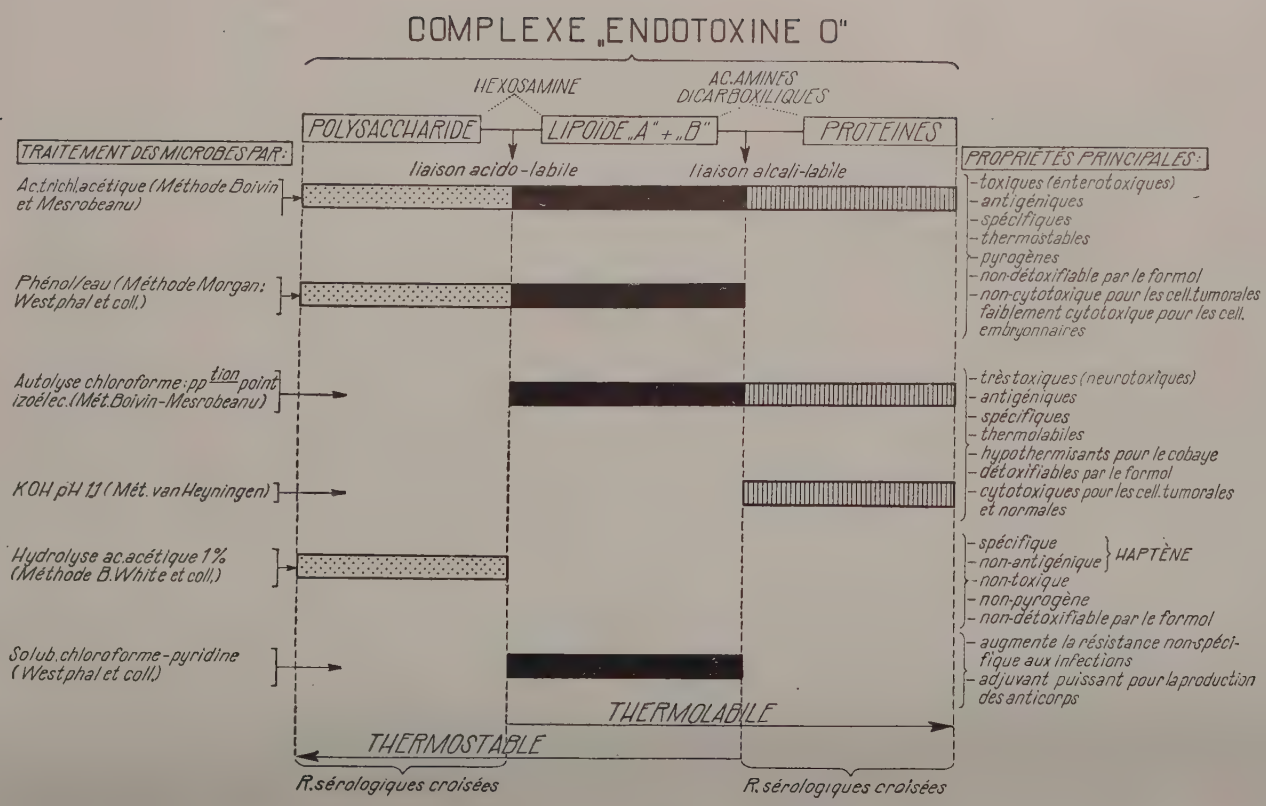
On savait que des protéines toxiques — des neurotoxines — existaient seulement chez le bacille de *Shiga*. Nous avons préconisé (3,4) que la neurotoxine de *Shiga* « R » était identique à celle des variantes « S », vu qu'elle provoquait les mêmes symptômes chez l'animal et, par conséquent, qu'il était préférable de travailler avec les variantes « R », afin de ne pas être gênés dans le processus d'extraction par la présence de l'endotoxine « O ». Dans ce travail, nous avons démontré que la neurotoxine de *typhi murium* « R » est sérologiquement différente de celle de la neurotoxine « S » et par conséquent, on ne peut pas substituer la variante « R » à la variante « S » pour l'extraction de ces protéines toxiques. Ces constatations sont identiques pour le b. *Shiga*, comme nous allons le publier prochainement.

Grabar et Gallut (9,10) ont démontré l'existence d'une protéine toxique chez le vibrion cholérique, mais ils sont arrivés à la conclusion qu'elle n'était pas antigénique. Cette toxine du vibrion provoquait la mort des animaux en 2—3 jours en état de hypothermie. Ces auteurs n'ont pas décrit des phénomènes neurotoxiques, mais ils ont émis l'hypothèse, avant Boroff (6,7) pour la neurotoxine de *Shiga*, que les protéines toxiques pourraient faire partie initialement du complexe glucido-lipido-polypeptidique du vibrion et qu'elles seraient libérées seulement par l'autolyse cellulaire.

Freter (8) décrit également l'existence de deux toxines chez le vibrion; l'une acido-soluble et l'autre acido-insoluble. Ces deux toxines correspondent, à notre avis, à l'endotoxine « O » et à la neurotoxine « S » du point de vue qualités physico-chimiques et biologiques.

Plus récemment Jenkin et Rowley (12) ont isolé, toujours à partir du vibrion cholérique, une protéine toxique et affirment d'après les résultats immunologiques (non-publiés) qu'elle ferait partie de l'antigène Boivin.

Boroff (6,7), travaillant sur le bacille de *Shiga*, est arrivé à la conclusion que la neurotoxine de la variante « S » est antigénique et du fait qu'elle présente des réactions croisées avec l'endotoxine « O », elle ferait initialement partie de ce complexe, à partir duquel elle se libérerait par l'autolyse. Ces constatations


COMPLEXE „ENDOTOXINE O"
HEXOSAMINE
AC.AMINES DICARBOXILIQUES
POLYSACCHARIDE
LIPOIDE „A" + „B"
PROTEINES
TRAITEMENT DES MICROBES PAR:
liaison acido-labile
liaison alcali-labile
PROPRIÉTÉS PRINCIPALES:
Ac.trichlacétique (Méthode Boivin et Mesrobeanu)
- toxiques (énterotoxiques)
- antigéniques
- spécifiques
- thermostables
- pyrogènes
- non-détoxifiable par le formol
- non-cytotoxique pour les cell.tumorales faiblement cytotoxique pour les cell. embryonnaires
Phénol/eau (Méthode Morgan: Westphal et coll.)
Autolyse chloroforme: pp tion point izoélec. (Mét.Boivin-Mesrobeanu)
- très toxiques (neurotoxiques)
- antigéniques
- spécifiques
- thermolabiles
- hypothermisants pour le cobaye
- détoxifiables par le formol
- cytotoxiques pour les cell.tumorales et normales
KOH pH 11 (Mét. van Heyningen)
Hydrolyse ac.acétique 1% (Méthode B.White et coll.)
- spécifique
- non-antigénique
HAPTÈNE
- non-toxique
- non-pyrogène
- non-détoxifiable par le formol
Solub. chloroforme-pyridine (Westphal et coll.)
- augmente la résistance non-spécifique aux infections
- adjuvant puissant pour la production des anticorps
THERMOLABILE
THERMOSTABLE
R.sérologiques croisées
R.sérologiques croisées

ont déterminé Boroff à attaquer la conception de la dualité des toxines du bacille *Shiga*.

La neurotoxine de *Shiga* « R », d'après cet auteur, est non-antigénique et ce fait serait dû à la quantité minime de substances réductrices qu'elle contient.

Nos résultats démontrent que les toxines protéiques thermolabiles des variantes « S » et « R » de *typhi murium* sont antigéniques, la neurotoxine « S » étant plus toxique et plus antigénique que la neurotoxine « R ».

Il existe dans les résultats que nous avons exposés concernant le bacille de *typhi murium*, la certitude que du point de vue sérologique la neurotoxine de la variante « S » donne des réactions croisées avec le sérum anti-endotoxine « O » et vice-versa. Cette réaction croisée n'existe pas entre la neurotoxine « R » d'une part, et la neurotoxine « S », d'autre part.

L'activité biologique de la neurotoxine « R » est identique à celle de la neurotoxine «S», bien que par rapport à leur poids d'azote, cette dernière soit plus toxique.

L'activité toxique plus réduite chez la neurotoxine « R » va de pair avec une antigénéicité plus faible.

Un fait frappant est la similitude de la chromatographie en amino-acides des neurotoxines « S » et «R », sérologiquement dissemblables et la différence qualitative et quantitative qui existe dans la chromatographie de la neurotoxine « S » et celle de la protéine de l'endotoxine « O » sérologiquement apparentées.

Par clivage chimique acide, nous n'avons pu isoler de l'endotoxine » O » une protéine toxique, fait dû à la labilité de cette substance.

Nous avons pu démontrer dans les autolysats du bacille de *typhi murium* « S » la coexistence de quantités notables d'endotoxine « O » et de neurotoxine et que par le prolongement du temps d'autolyse, tant l'endotoxine « O » que la neurotoxine, diminuent comme rendement. Ce fait nous a permis de conclure que la neurotoxine n'est pas issue de l'endotoxine « O », en voie d'autolyse. Du reste, si les toxines protéiques des variantes « S » seraient générées par l'endotoxine « O » comment pourrait-on expliquer leur présence dans les variantes « R » qui sont dépourvues du complexe glucido-lipido-polypeptidique ? Il faut logiquement admettre que les neurotoxines « S » et « R » ont une individualité chimique bien définie, même si dans les variantes « S » une certaine proportion est capable, dans des conditions qui restent à être établies, de s'unir avec des substances polysaccharidiques pour former le complexe d'endotoxine «O». Le fait que les neurotoxines existent également libres dans la cellule bactérienne est confirmé par les observations de Boivin, Delaunay et Sarciron (5) qui ont démontré qu'il suffit de perméabiliser la membrane cellulaire par un chauffage de 1 heure à 56° pour que 25% de la neurotoxine des variantes « S » et « R » de *Shiga* passe dans le milieu ambiant ce que nous avons démontré également pour le b. *typhi murium*

Si le couplage avec le polysaccharide spécifique et non-toxique « per se » a lieu dans les variantes « S » comme il ressort de nos expériences immunologiques, il faut nécessairement reconnaître qu'il en résulte un complexe dans lequel toutes les qualités physico-chimiques et biologiques, sauf celles antigéniques et sérologiques, sont très différentes de celles présentées par les neurotoxines libres.

Les faits que nous avons présentés chez le bacille de *typhi murium* (b. Aertrycke-Bucarest), démontrent qu'il est possible de trouver chez ce germe

trois endotoxines: l'endotoxine « O », la neurotoxine « S » et la neurotoxine « R ».

Il ressort, en plus, que dans les phénomènes de variation « S—R », les germes perdent leur capacité de former de l'endotoxine « O » et que la neurotoxine change de spécificité.

En ce qui concerne la structure du complexe d'endotoxine « O » des variantes « S » des germes Gram-négatifs sur lesquels nous avons travaillé et en résumant nos connaissanses à l'heure actuelle sur sa structure et ses propriétés ainsi que les componentes qu'on peut extraire de la cellule microbienne, nous proposons le schéma réprésenté dans le graphique 1. Nous croyons qu'il serait utile à l'avenir de réserver le terme d'endotoxine « O » seulement au complexe glucido-lipido-polypeptidique, capable d'engendrer deux anticorps, le dilipopolysaccharide et la lipoprotéine représentant des fractions de ce complexe immunologiquoment distinctes.

Les résultats que nous avons rapportés pourront à l'avenir avoir des conséquences pratiques, étant donné que certains auteurs préconisent l'utilisation des fractions microbiennes à la place des vaccins corpusculaires.

CONCLUSIONS

1. A partir de bacilles vivants *typhi murium* « S » et « R », nous avons extrait par autolyse chloroformique et précipitation avec de l'acide trichloracétique, au point isoélectrique, des protéines toxiques thermolabiles (neurotoxines).

2. La neurotoxine « S » et la neurotoxine « R » de *typhi murium* sont antigéniques et ne donnent pas de réactions sérologiques croisées entre elles.

3. La neurotoxine « S » et l'endotoxine « O » donnent des réactions sérologiques croisées.

4. La neurotoxine « S » est plus toxique et possède un pouvoir antigénique plus grand que la neurotoxine « R ».

5. L'endotoxine « O » provoque chez le lapin l'apparition d'un anticorps réagissant avec l'haptène polysaccharidique et un autre réagissant avec la neurotoxine « S ».

6. Le chromatogramme en amino-acides des neurotoxines « S » et « R » sont identiques, malgré leur dissemblance sérologique tandis que le chromatogramme de la protéine de l'endotoxine « O » présente des différences qualitatives et quantitatives par rapport à celles de la neurotoxine « S », bien qu'elles donnent des réactions croisées entre elles.

7. Dans les autolysats de la variante « S », la neurotoxine et l'endotoxine « O » coexistent, quelque soit le temps d'autolyse.

8. Les protéines toxiques de *typhi murium* sont thermolabiles; elles peuvent être transformées en anatoxines par le formol, engendrent, dans certaines concentrations, des phénomènes de parèse des membres postérieurs chez les souris et chez les lapins et provoquent des difficultés respiratoires et souvent de la diarhrée.

9. Ces toxines contiennent une quantité de 20 30% de lipides.

10. Les neurotoxines préparées selon la méthode de van HEYNINGEN (première étape de purification), contiennent seulement 4 - 6% de lipides. Néanmoins, elles sont nettement toxiques pour l'animal.

11. Des toxines lipoprotéiques ont été extraites à l'aide de notre technique à partir d'une série de germes Gram-négatifs, tels que les *b. «Gärtner»* « S » et « R », *b. Flexner b. Sonne* « S » et « R », *b. Schmitz*, *b. Proteus* X_{19}, *b. Coli*, *b. pyocyanique*, *Serratia marcescens* etc. et leur action sur la souris semble identique à celle de *typhi murium*. La toxicité de ces produits est en rapport avec les germes et la variante à partir desquels ils ont été extraits, avec la quantité et la voie d'inoculation.

12. Les réactions immunologiques démontrent que dans la variante « S » une partie de la neurotoxine s'unit avec le polysaccharide spécifique pour former le complexe d'endotoxine « O ».

BIBLIOGRAPHIE

1. Binkley F., Goebel W., et Perlman E. — J. Exp. Med., 1945, **81,** 331.
2. Boivin A., Mesrobeanu I. et Mesrobeanu L. — C. R. Soc. Biol., 1933, **113,** 490.
3. Boivin A et. Mesrobeanu L. — C. R. Soc. Biol., 1937, **124,** 222, 323, 439, 442, 446, 652, 796.
4. Boivin A. et Mesrobeanu L. — C. R. Acad. Sc., 1937, **204,** 302, 1759.
5. Boivin A., Delaunay A et Sarciron R. — C. R. Soc. Biol., 1940, **134,** 357, 361.
6. Boroff D. A. — J. Bact., 1949, **57,** 617.
7. Boroff D. A. et Macri B. J. — J. Bact., 1949, **58,** 387.
8. Freter R. — J. inf. Dis., 1956, **99,** 207.
9. Gallut J. et Grabar P. — Ann. Inst. Pasteur, 1945, **71,** 33.
10. Grabar P. et Gallut J. — Ann. Inst. Pasteur, 1945, **71,** 323.
11. Goebel W. F., Binkley F. et Perlman E. — J. exp. Med., 1945, **81,** 315.
12. Heyningen W. E. van et Gladstone G. P. — Brit. J. exp. Path., 1953, **34,** 202.
13. Jenkin C.R. et Rowley D. — J. gen. microb. 1959, **21,** 191.
14. Jordan E.D. et Burrows W. — J. inf. Dis. 1935, **57,** 121.
15. Landy M. — dans « Biochemical aspects of microbial pathogenicity », Ann. N.Y. Acad. Sc., 1960, **88,** Art. 5, p. 1273.
16. Mesrobeanu L. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1936, **9,** 1.
17. Mesrobeanu L. et Calalb G. — C. R. Soc. Biol., 1936, **122,** 490.
18. Mesrobeanu L., Alexenco E. et Mitrica N. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960, **19,** 211.
19. Westphal O. et Luderitz O. — Angewandte Chemie, 1954, **66,** 407.
20. Westphal O. — Ann. Inst. Pasteur, 1960. **98,** 789.

ТЕРМОЛАБИЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ (НЕЙРОТОКСИНЫ) ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

СООБЩЕНИЕ I. НЕЙРОТОКСИНЫ ПАЛОЧКИ *TYPHI MURIUM* «S» и «R»

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Авторы выделили токсические термолабильные протеины (нейротоксины) из живых палочек *Typhi murium* «*S*» и «*R*» при помощи аутолиза, с использованием хлороформа и осаждением трихлоруксусной кислотой при изоэлектрической точке.

2. Нейротоксин «*S*» и нейротоксин «*R*» палочки *Typhi murium* обладают антигенными свойствами и не дают между собою перекрестных серологических реакций.

3. Нейротоксин «*S*» и эндотоксин «O» дают перекрестные серологические реакции.

4. Нейротоксин «*S*» более токсичен и он обладает более выраженными антигенными свойствами по сравнению с нейротоксином «*R*».

5. Эндотоксин «O» вызывает у кроликов появление антитела которое реагирует с полисахаридным гаптеном и появление другого антитела, реагирующего с нейротоксином «*S*».

6. Хроматограммы содержания аминокислот в нейротоксинах «*S*» и «*R*» являются тождественными, несмотря на серологическое их несходство, а в хроматограмме протеина эндотоксина «O» отмечаются качественные и количественные различия по сравнению с нейротоксином «*S*», несмотря на то, что они дают перекрестные между собою реакции.

7. При аутолизе варианта «*S*», нейротоксин и эндотоксин «O» сосуществуют при любой продолжительности аутолиза.

8. Токсические протеины *Typhi murium* являются термолабильными; при обработке формалином они превращаются в анатоксины, а в определенных концентрациях они вызывают явления пареза задних конечностей у мышей и кроликов; они могут вызывать расстройства дыхания, а также и поносы у этих животных.

9. В стадии очистки, на которой остановились до настоящего времени авторы, эти токсины содержат 20—30% липидов.

10. Нейротоксины, приготовленные по методу ван Гейнингена (первый этап очистки) содержат только 4—6% липидов. Все же, они обладают сильным токсическим действием на животных.

11. Протеиновые токсины, при помощи предложенного метода, были выделены также из ряда других грамотрицательных возбудителей: *B. Flexner*, *B. Sonne*, «*S*» и «*R*», *B. proteus* X-19, *B. pyocyan.*, *B. coli* и т.д. и их действие на мышей, повидимому, тождественно с действием токсинов *Typhi murium*. Токсичность этих препаратов находится в зависимости от возбудителей, из которых они были получены, от их количества и от путей введения.

12. Иммунологические реакции доказывают что у варианты часть нейротоксина «*S*» объединяется с специфическим полисахаридом, образуя комплекс эндотоксина «*O*».

THERMOLABILE ENDOTOXINE (NEUROTOXINE) DER GRAM-NEGATIVE BAKTERIEN

I. MITTEILUNG. NEUROTOXINE DER *S. TYPHI MURIUM* "S" UND "R".

ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus lebenden Keimen von *S. typhi-murium* « S » und « R » wurden durch Chloroformautolyse und Ausfällung mit Trichloressigsäure im isoelektrischen Punkt, thermolabile toxische Eiweissstoffe (Neurotoxine) extrahiert.

2. Die « S » und « R »-Neurotoxine von *S. typhi- murium* besitzen antigene Eigenschaften und geben untereinander keine gekreuzten serologischen Reaktionen.

3. « S »-Neurotoxin und « O »-endotoxin geben serologische Kreuzreaktionen.

4. « S »-Neurotoxin ist toxischer und antigenisch wirksamer als « R »-Neurotoxin.

5. « O »-Endotoxin ruft beim Kaninchen die Bildung einem Antikörpers hervor, der mit dem Polysaccharidhapten reagiert um eines anderen, der mit « S »-Neurotoxin reagiert.

6. Die Aminosäurechromatogramme der « S »-und « R »-Neurotoxine sind trotz der serologischen Verschiedenartigkeit identisch, und das Eiweisschromatogramm des « O »-Endotoxins unterscheidet sich qualitativ und quantitativ von dem des « S »-Neurotoxins, obwohl diese beiden Toxine Kreuzreaktionen aufweisen.

7. In den Autolysaten der « S »-Variante sind Neurotoxin und « O »-Endotoxin nebeneinander vorhanden, wie lange auch die Autolyse dauern mag.

8. Die toxischen Eiweissstoffe von *S. typhi-murium* sind thermolabil; durch Formaldehyde können sie in Toxoide umgewandelt werden; in bestimmten Konzentrationen rufen sie, bei Mäusen und Kaninchen, Parese der hinteren Extremitäten hervor und können Atmungsschwierigkeiten und Diarrhöe verursachen.

9. Im bisher erreichten Reinheitszustand enthalten diese Toxine 20—30% Fettstoffe.

10. Die nach Van Heyningens Verfahren hergestellten Neurotoxine (erste Stufe der Reinigung) enthalten nur 4—6% Fettstoffe. Sie weisen trotzdem, bei Tieren, eine ausgeprägte Toxizität auf.

11. Vermittels unseres Verfahrens wurden Eiweissstoxine aus einer Reihe Gram-negativer Keime, wie Gärtnerbazillen «S» und «R» Flexnerbazillen, Sonnebazillen « S » und « R »,

Schmitzbazillen, *Proteus* X_{19}, Colibazillen, *B. pyocyaneus*, etc. extrahiert. Ihre Wirkung bei der Maus scheint die gleiche, wie beim Toxin von *S. typhi-murium* zu sein. Die Toxizität dieser Produkte hängt von der Art der Keime, aus welchen sie gewonnen wurden, von der Menge und dem Verabreichunsgweg ab.

12. Die immunologischen Reaktionen weisen dass in der Variante « S », ein Teil der Neurotoxine sich mit dem spezifischen Polysaccharid verbindet um das Endotoxin « O » -Komplex zu bilden.

THE THERMOLABILE ENDOTOXINS (NEUROTOXINS) OF GRAM-NEGATIVE GERMS

NOTE I. THE NEUROTOXINS OF «*S. TYPHI MURIUM* » S » AND « R »

SUMMARY

1. By means of chloroform autolysis and precipitation with trichloroacetic acid at the isoelectric point, thermolabile toxic proteins (neurotoxins) have been isolated from living germs of *S. typhi-murium* « S » and « R ».

2. The « S » neurotoxin and the « R » neurotoxine of *S. typhi-murium* are antigenic and give not serological cross reactions.

3. « S » neurotoxin and « O » endotoxin give serological cross reactions.

4. « S » neurotoxin is more toxic and displays a greater antigenic potency than « R » neurotoxin.

5. « O » endotoxin determines the appearance in the rabbit of an antibody which reacts with the polysaccharide hapten and of another one which reacts with « S » neurotoxin.

6. The amino-acid chromatograms of the « S » and « R » neurotoxins are identical in spite of the serological differences, while the protein chromatogram of « O » endotoxin is qualitatively and quantitatively different from that of the « S » neurotoxin, although these toxins display cross reactions.

7. In the autolysates of the « S » variant, neurotoxin and « O » endotoxin coexist, whatever the duration of autolysis.

8. The toxic proteins of *S. typhi-murium* are thermolabile; they may be transformed into toxoids by means of formaldehyde; in certain concentrations, they cause paresis of the hind limbs in mice and rabbits and may cause impairment of respiration and diarrhoea.

9. In the stage of purification hitherto attained, these toxins contain 20—30 per cent lipids.

10. Neurotoxins prepared according to VAN HEYNINGEN's method (first stage of purification) contain only 4—6 per cent lipids. Nevertheless, they are definitely toxic in animals.

11. By means of our procedure, protein toxins have been extracted from a series of Gram-negative germs, such as *Sh. Gärtner* « S » and « R », *Sh. flexneri*,' *Sh. sonnei* « S » and « R », *Proteus* X_{19}, *Sh. Schmitz* colon bacilli, *B. pyocyaneus*, etc. Their action in mice appears to be the same as that of *S. typhi-murium* toxin. The toxicity of these products is related to the germs from which they have been extracted to their amount, and to their route of administration

12. The immunologic reactions demonstrate that in the « S » variant a part of the neurotoxin joins with the specific polysaccharide to from the endotoxin « O » complexe.

SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES DE CERTAINES SOUCHES DE *BRUCELLA*

NOTE I.

par

OFELIA DIMITRIU, AL. CERBU et TH. VASILESCO

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Zoonoses)

— Manuscrit reçu le 6 décembre 1960 —

La multiplication intra-cellulaire caractéristique à l'infection brucellique rend difficile le traitement de cette maladie par des substances antibiotiques, par comparaison aux autres infections dans lesquelles les germes sont directement influencés par les substances bactéricides ou bactériostatiques.

Le fait bien connu que la sensibilité des germes aux antibiotiques « in vitro » diffère de la sensibilité « in vivo » est d'autant plus valable pour les *Brucella ;* en effet, dans l'infection brucellique, à part le stade bactériémique, les germes sont cantonnés dans les cellules réticulo-histiocytaires des différents tissus et organes, ce qui rend encore plus difficile l'action « in vivo » des antibiotiques.

Pour ces raisons, la détermination de la sensibilité des *Brucella* envers les substances chimio-thérapeutiques et antibiotiques à spectre large, devient d'autant plus nécessaire dans l'infection brucellique.

Dans la présente note, nous avons étudié le comportement d'un certain nombre de souches de *Brucella*, — isolées en Roumanie et à l'étranger, conservées dans la collection du Laboratoire de Brucellose de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino », — envers quelques substances chimio-thérapeutiques et antibiotiques par comparaison aux souches de référence des trois types de *Brucella : melitensis 16 M Beltsville, abortus 544 Weybridge* et *suis 1330 Mineapolis.*

MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a étudié 79 souches de *Brucella*, dont 52 indigènes et 27 de provenance étrangère, réparties selon le type, comme suit:

Type	Souches			
	indigènes	étrangères	étrangères de référence	Total
Br. abortus	19	10	1	30
Br. suis	32	6	1	39
Br. melitensis . . .	1	8	1	10
Total . . .	52	24	3	79

Nous avons utilisé la méthode diffusimétrique Erna Lund avec des rondelles en papier filtre. Les souches de *Brucella* conservées sur milieu 1. 2. Braun, ont été ensemencées sur le même milieu; après incubation à 37° (48 heures) des cultures respectives, on a préparé des suspensions (eau chlorurée isotonique) en concentration de 10 miliards cellules/ml.

Les tests on été effectués en gélose 2%, peptone Witte, pH = 7,0 sur boîtes Petri (preparées 48 72 heures auparavant). Sur les rondelles (⌀15 mm) on a déposé à l'aide d'une pipette de précision les solutions antibiotiques comme suit:

1. Nitrofuran	0,1 g	conc./ml	30γ	conc./rondelle
2. Sulfathiazol	0,5 g	conc./ml	200γ	conc./rondelle
3. Pénicilline G	200 U	conc./ml	6 U	conc./rondelle
4. Streptomycine	10.000γ	conc./ml	300γ	conc./rondelle
5. Choloromycétine	1.000γ	conc./ml	30γ	conc./rondelle
6. Erythromycine	1.000γ	conc./ml	30γ	conc./rondelle
7. Terramycine	1.000γ	conc./ml	30γ	conc./rondelle
8. Auréomycine	1.000γ	conc./ml	30γ	conc./rondelle

Les concentrations utilisées se trouvent dans les limites des concentrations employées par la majorité des laboratoires, conformément aux données de l'OMS.

La lecture des résultats a été faite après incubation à 37° pendant 48 heures des boîtes ensemencées, où on avait appliqué les rondelles imprégnées d'antibiotiques, en notant le diamètre de la zone d'inhibition (diamètre de la rondelle inclu), comme suit:

⌀15 mm — résistance
⌀16—20 mm — résistance relative
⌀21—29 mm — sensibilité modérée
dépassant 30 mm — sensibilité accentuée

RÉSULTATS

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux annexes, par types de *Brucella*. A remarquer que la sensibilité des souches indigènes concorde en géneral à celle des souches de référence.

Tableau I

Brucella melitensis — Sensibilité aux antibiotiques

No. crt.	Souche No.	Souche Désignation	Nitrofuran	Sulfathiazol	Pénicilline	Streptomycine	Chloromycétine	Erythromycine	Terramycine	Auréomycine
		Souche de référence								
1	86	M.16 Beltsville	15	15	15	45	40	40	35	38
		Souche indigène								
1	93	Bucureşti . . .	15	15	15	32	30	18	30	38
		Souches d'origine étrangère								
1	83	Foster	15	15	15	32	30	18	30	28
2	84	Paris	15	15	22	42	34	15	35	35
3	85	Paris H.16 . .	15	15	25	55	31	24	40	35
4	88	H.80 Arkwright	15	15	16	30	35	20	42	42
5	89	659	15	15	15	45	35	26	32	35
6	90	0.83	15	15	21	28	30	25	36	32
7	91	Lille	15	15	28	30	36	20	30	35
8	92	Paramelitensis Paris . . .	15	15	25	38	36	15	30	30

Tableau II

Brucella abortus — Sensibilité aux antibiotiques

No. crt.	Souche		Nitrofuran	Sulfathiazol	Pénicilline	Streptomycine	Chloromycétine	Erythromycine	Terramycine	Auréomycine
	No.	Désignation								
		Souche de référence								
1	15	544 Weybridge	15	15	15	50	50	15	52	50
		Souches indigènes								
1	17	30 Decembrie	15	15	26	30	30	15	45	36
2	18	D II	15	15	36	36	35	35	32	30
3	19	Timocea	15	15	15	34	35	15	45	43
4	20	Pantelimon	15	15	25	30	30	25	25	32
5	21	2082	15	15	25	45	35	15	40	40
6	22	3507	15	15	23	33	32	26	37	45
7	23	2064	15	15	15	38	37	15	40	32
8	24	Ilian I	15	15	20	30	30	15	35	38
9	25	Ilian II	15	15	36	42	40	15	32	30
10	26	Gheorghiță S	15	15	28	36	34	15	34	33
11	27	Gheorghiță R	15	15	27	25	23	17	20	18
12	28	195	15		22	25	25	15	32	30
13	29	178	15	15	15	23	20	15	30	30
14	30	122	15	15	15	30	36	15	36	31
15	31	65	15	15	15	22	20	15	30	25
16	32	2177	15	15	15	30	30	15	26	25
17	33	Rosia	15	15	28	32	36	15	36	35
18	34	8130	15	15	35	35	36	15	35	36
19	36	49	15	15	15	35	28	15	27	20
		Souches d'origine étrangère								
1	4	B 55	15	15	15	35	25	15	42	40
2	11	K	15	15	15	50	50	15	50	50
3	12	672 Vitoșa	15	15	35	45	33	15	32	35
4	13	Vitoșa	15	15	25	23	25	15	35	35
5	16	146	15	15	25	30	35	15	26	28
6	9	B 19	15	15	32	42	33	15	40	35
7	10	B 19 BA	15	15	25	35	30	15	33	31
8	37	D.G. 330	15	15	15	38	40	15	41	34
9	38	D.G. 75	15	15	15	22	34	15	26	29
10	39	S.L. 150	15	15	15	23	34	15	25	30

Le graphique reproduit procentuellement la sensibilité des souches testées, pour les trois types de *Brucella* vis-à-vis des antibiotiques étudiés.

L'analyse des données montre que les souches des *Brucella* ont été sans exception insensibles au nitrofuran et sulfathiazol, étant toutes sensibles à une partie des antibiotiques utilisés (streptomycine, chloromycétine, terramycine et auréomycine).

En ce qui concerne la penicilline et l'érythromycine, on a observé que les trois types de *Brucella* se comportent différemment:

Tableau III

Brucella suis — Sensibilité aux antibiotiques

No. crt.	Souche		Nitro-furan	Sulfa-thiazol	Pénicil-line	Strepto-mycine	Chloro-mycé-tine	Ery-thromy-cine	Terra-mycine	Auréo-mycine
	No.	Désignation								
		Souche de référence								
1	18/57	S 1330 Mineapolis	15	15	35	40	40	40	40	40
		Souches indigènes								
1	40	Scheia	15	15	30	40	40	32	45	45
2	41	Dîlga	15	15	25	20	35	23	37	30
3	42	Orăştie	15	15	30	40	40	28	40	40
4	43	Leorda	15	15	30	39	36	25	34	39
5	44	Hofmann	15	15	26	26	30	24	23	26
6	45	Pallas	15	15	40	35	45	35	32	48
7	46	Redea	15	15	32	30	35	25	32	32
8	47	Todireşti	15	15	35	38	35	26	45	45
9	48	Filiaşi	15	15	26	21	36	21	28	30
10	49	G.F.	15	15	35	35	38	33	45	50
11	50	G.1	15	15	29	36	34	25	30	26
12	51	2581	15	15	32	35	35	27	42	45
13	59	156	15	15	32	30	35	30	45	45
14	60	Marele alb	15	15	25	29	34	26	34	31
15	63	519	15	15	33	35	40	30	38	44
16	64	140	15	15	26	25	37	26	35	34
17	65	1575	15	15	34	35	40	30	35	40
18	66	3832	15	15	36	33	39	26	27	31
19	67	C.B.1	15	15	35	40	35	27	27	30
20	68	C.B.3	15	15	32	31	32	24	25	28
21	69	39	15	15	30	40	40	30	40	50
22	70	93 F	15	15	30	35	31	22	25	26
23	72	Sericu	15	15	28	22	31	29	31	24
24	73	C.5	15	15	25	40	40	32	40	40
25	74	C.7	15	15	31	33	36	25	34	33
26	75	C.12	15	15	32	45	40	30	32	30
27	76	C.13	15	15	30	33	34	25	21	30
28	77	I.17	15	15	30	36	35	28	32	32
29	79	I.20	15	15	21	38	38	36	45	45
30	80	T.M.23	15	15	40	40	40	32	38	45
31	81	T.31	15	15	31	35	42	24	35	36
32	82	612	15	15	30	29	26	23	19	28
		Souches d'origine étrangère								
1	54	Lille	15	15	15	50	50	15	50	50
2	55	34 Paris	15	15	39	45	45	40	45	40
3	56	Pycek	15	15	41	37	40	35	45	48
4	61	America	15	15	32	42	40	30	35	38
5	62	Danica	15	15	35	30	38	25	35	40
6		S6 Montpellier	15	15	21	36	31	26	31	35

— *souches de Br. suis*

pénicilline — souches indigènes sensibles en proportion de 100%
souches étrangères sensibles en proportion de 60%

érythromycine — souches indigènes sensibles en proportion de 100%
souches étrangères sensibles en proportion de 86%

— *souches de Br. abortus*

pénicilline — souches indigènes sensibles en proportion de 58%
souches étrangères sensibles en proportion de 45%

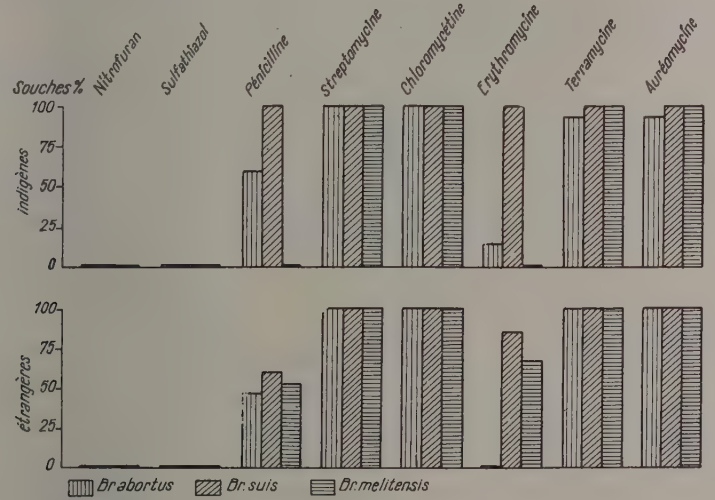
érythromycine — souches indigènes sensibles en proportion de 16%
souches étrangères — insensibles

— *souches de Br. melitensis*

pénicilline — souche indigène — insensible
souches étrangères sensibles en proportion de 55%

érythromycine — souche indigène — faiblement sensible (⌀ 18 mm)
souches étrangères sensibles en proportion de 66%

Il résulte donc, que le type *suis* a présenté la plus grande sensibilité et le type *abortus* la plus réduite; les souches indigènes ont éte plus sensibles que celles d'origine étrangère.



Graphique 1. — Sensibilité des souches de *Brucella* vis-à-vis des antibiotiques étudiés.

Selon nos expériences, on a constaté une sensibilité à la pénicilline variant entre 45—100% — par rapport au type de *Brucella* et l'origine de la souche, fait qui peut être expliqué par la concentration plus forte des antibiotiques utilisés par nous, en comparaison avec les concentrations employées par d'autres auteurs (cités par PACHECO).

Par rapport à la forme (« S ou « R ») nous n'avons pas observé de différences de sensibilité des souches isoles de l'homme ou des animaux.

CONCLUSIONS

Les tests de la sensibilité aux antibiotiques de 79 souches de *Brucella*, indigènes et d'origine étrangère, ont montré, en général, une sensibilité accrue envers les antibiotiques utilisés, à l'exception de la pénicilline et de l'érythro-

mycine. Vis-à-vis de ces 2 derniers on a constaté une diminution de la sensibilité des souches étrangères par rapport aux souches indigènes; selon le type, la *Br. suis* a été la plus sensible (95—97%), suivie par la *Br. melitensis* (50—60%), la *Br. abortus* étant la mois sensible (10—53%).

Toutes les souches étudiées ont été résistantes aux deux chimiothérapeutiques testés.

BIBLIOGRAPHIE

1. Guerra M. et Sughi R. — Nuovi Ann. Ig. Microb., 1960, 8, 255.
2. O.M.S. — Comité d'experts pour les antibiotiques. Enquête sur les tests de la sensibilité aux antibiotiques dans différents pays, 1960.
3. Pacheco G. et de Mello M. T. — La Brucellose, Rio de Janeiro, 1956, 80.
4. Terni M. et Tesi A. — Boll. Ist. Sier. Milan, 1949, **28**, 259.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ *BRUCELLA* К НЕКОТОРЫМ АНТИБИОТИКАМ

СООБЩЕНИЕ I.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Тестирование местных и заграничных 79 штаммов *Brucella* в отношении антибиотиков указало вообще на выраженную их чувствительность к примененным антибиотикам, за исключением пенициллина и эритромицина. В отношении этих 2 антибиотиков была установлена сниженная чувствительность заграничных штаммов по сравнению с местными штаммами. Тип *Br. suis* оказался наиболее чувствительным, а после него следует *Br. melitensis* (50—60%). *Br. abortus* оказался наименее чувствительным (10—53%).

Все тестированные штаммы оказались чувствительными к обоим использованным химиотерапевтическим препаратам.

DIE EMPFINDLICHKEIT EINER ANZAHL VON BRUZELLENSTÄMMEN FÜR EINIGE ANTIBIOTIKA

I. MITTEILUNG

ZUSAMMENFASSUNG

Aus den Bestimmungen der Empfindlichkeit von 79 einheimischen und ausländischen Bruzellenstämmen für Antibiotika ergab sich, dass im allgemeinen eine ausgeprägte Empfindlichkeit für die verwendeten Antibiotika, mit Ausnahme des Penizillins und Erythromyzins vorlag. Was die letzteren anbetrifft, waren die ausländischen Stämme weniger empfindlich als die einheimischen; hinsichtlich der Typen, war *Br. suis* am empfindlichsten (95—97%), gefolgt von *Br. melitensis* (50—60%), während *Br. abortus* die geringste Empfindlichkeit aufwies (10—53%).

Alle geprüften Stämme waren gegen die zwei verwendeten Chemotherapeutika widerstandsfähig.

THE SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS OF A NUMBER OF *BRUCELLA* STRAINS

NOTE I.

SUMMARY

The susceptibility to antibiotics was tested in 79 indigenous or foreign *Brucella* strains. On the whole, all these strains proved to be highly susceptible to the antibiotics used, with the exception of penicillin and erythromycin. As regards the latter, the foreign strains were found to be less susceptible than the indigens ones; in relation to types, *Br. suis* was the most susceptible (95 - 97 per cent), followed by *Br. melitensis* (50—60 per cent), while *Br abortus* displayed the lowest susceptibility (10—53 per cent).

All the strains tested were resistant to the chemotherapeutic drugs used.

EFFET CYTOTOXIQUE DE LA *BORDETELLA PERTUSSIS* SUR LES CULTURES DE TISSU HeLa, Kb, DETROIT ET TISSU D'EMBRYON HUMAIN

NOTE I.

par

N. Pozsgi, Viorica Andreesco-Ţigoiu et D. Dona

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Pertussis et de la Chaire de Microbiologie II de l'Institut Médico-Pharmaceutique de Bucarest)

— Manuscrit reçu le 4 mars 1961 —

Le présent travail a eu pour but l'étude du comportement des cultures de tissu de différents types cellulaires, en couche monocellulaire vis à-vis de la *Bordetella pertussis*, la possibilité de cultiver ce microbe dans les cultures tissulaires de cellules HeLa, Kb, Detroit, tissu embryonnaire humain et la détermination des effets cytotoxiques induits par le métabolisme de ces germes et des produits endotoxiques résultés à la suite de leur décomposition. On a également étudié la possibilité de leur phagocytose et de leur multiplication dans l'intérieur du cytoplasme (1, 2, 3).

Les données obtenues nous permetteront ultérieurement de poursuivre l'action des fractions antigéniques sur les cultures de tissus, de vérifier l'action neutralisante de la gamma-globuline et, par la suite, d'établir l'action cytotoxique de certaines suspensions vaccinantes de *Pertussis* (4, 5).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a utilisé trois types différents de cultures cellulaires provenant de tissus néoplasiques: HeLa [1] (cancer de col utérin), Kb [2] (carcinome bucal) et Detroit-6 [3] (mœlle leucemoïde), ainsi qu'une culture de cellules embryonnaires humaines [4] obtenue par trypsinisation de l'embryon total. Les cultures, préparées en tubes d'essai 16/160, ont été utilisée au moment où la couche de cellules était confluente en couche monocellulaire.

En général, les milieux de culture utilisés contenaient de l'hydrolysat de lactalbumine, de la solution Hanks comme diluant, du sérum de cheval pour

[1]) Culture cellulaire stable HeLa — provenance: Institut Pasteur, Paris 1956.

[2]) Culture cellulaire stable kb — provenance: Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Torino, 1959.

[3]) Culture cellulaire stable Detroit-6 — provenance: Laboratoire d'Etat de Bact., Stockholm, 1959.

[4]) Culture cellulaire d'embryon humain obtenue dans le Laboratoire d'Entérovirus de l'Institut dr. I. Cantacuzino de Bucarest.

les types cellulaires provenus des tissus néoplasiques et du sérum de veau pour la culture de tissu d'embryon humain, pH = 7,4; les milieux n'ont pas été additionnés d'antibiotiques.

Les quantités de sérum d'animal des milieux d'enrichissement et d'entretien ont varié pour chaque souche cellulaire (Tableau I). Les quantités de sérum contenues dans les milieux d'entretien des cultures inoculées ont varié entre 1/2—1/4, par rapport aux quantités des milieux d'enrichissement.

Tableau I

Composition des milieux de croissance et d'entretien

Ingrédients nécessaires	Culture Kb		Culture HeLa		Culture Detroit-6		Culture d'embryon humain
	milieu (en volumes)						
	de croissance	d'entretien	de croissance	d'entretien	de croissance	d'entretien	d'entretien
Hydrolysat de lactalbumine sol. 5%	10	10	10	10	10	10	10
Sérum de cheval inactivé	10	2,5	20	10	15	8	—
Sérum de veau	10	2,5	—	—	—		
Sol. de bicarbonate de sodium 55‰	2	2	2	2	2	2	2
Sol. Hanks	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

On a utilisé une culture de 48 heures de *Bordetella pertussis* lyophilisée, passée sur milieu Bordet-Gengou.

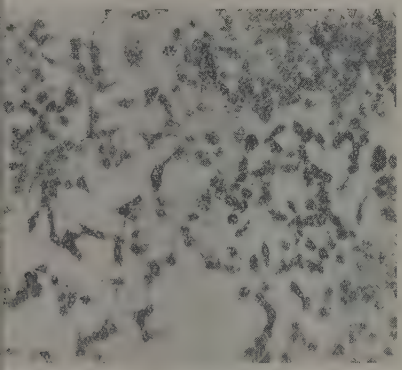
Les cultures de cellules en tubes des souches mentionnées, en couches confluentes, dans 2 ml milieu de culture, sont inoculées avec une suspension de *Bordetella pertussis* en volume de 0,05 ml avec les concentrations finales suivantes:

250.000 microbes/2 ml par tube d'essai
50.000 microbes/2 ml par tube d'essai
10.000 microbes/2 ml par tube d'essai
2.000 microbes/2 ml par tube d'essai
400 microbes/2 ml par tube d'essai

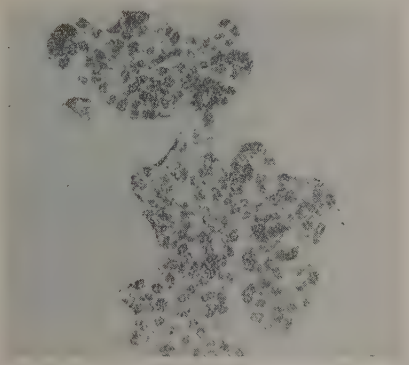
Les 5 tubes contenant les cultures de cellules inoculées avec les suspensions de *Bordetella pertussis*, ainsi que les 5 tubes témoins non-inoculés, sont maintenus à 37°C et contrôlés périodiquement, à intervalles de 24 heures, au microscope (ob. x 10 et oc. x7). Aux mêmes intervalles, on a fait des colorations des cultures par la technique May-Grünwald-Giemsa.

RÉSULTATS

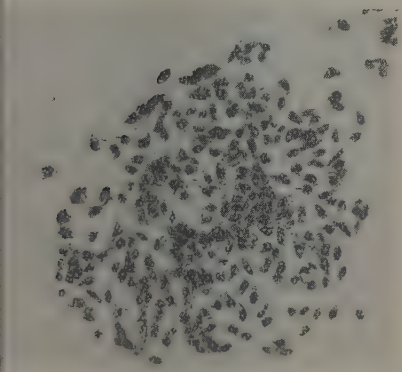
1. Les cellules normales de la souche HeLa présentent des élements cellulaires avec tissu chromatinien en réseau fin, avec nucléoles et cytoplasma à aspect clair, parsemé de rares zones de condensations cytoplasmatiques (Photo 1).



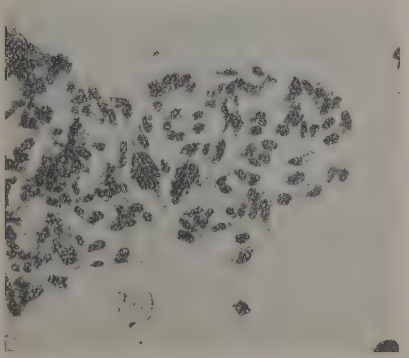
Photographie 1. — Témoin HeLa, culture de 120 heures. × 100. Elements cellulaires avec la trame chromatinienne en réseau fin, contenant des nucléoles à aspect clair; le cytoplasma est clair avec de rares zones de condensations cytoplasmatiques.



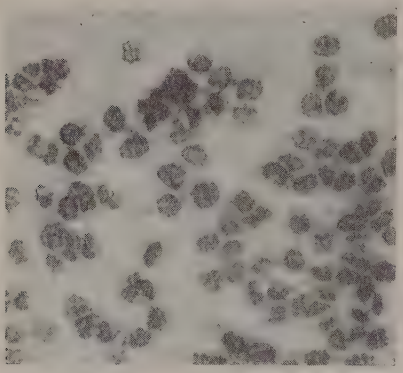
Photographie 2. — Culture HeLa de 48 heures — 72 heures après l'infection avec 250.000 germes. × 100. Altérations des élements cellulaires caractérisées par de multiples vacuolisations nucléo-cytopasmatiques, avec prépondérance cytoplasmatique. Le cytoplasma présente de nombreux germes *(B. pertussis)*.



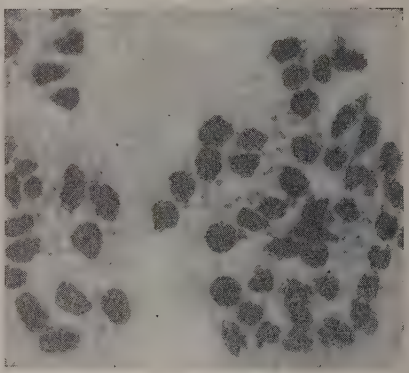
Photographie 3. — Culture HeLa de 48 heures — 72 heures après l'infection avec 50.000 germes. × 100. Epaississement chromatinien allant parfois jusqu'à la pycnose. Le cytoplasma des éléments cellulaires est de couleur pâle et contient de nombreux germes *(B. pertussis)*, étant par places effilé.



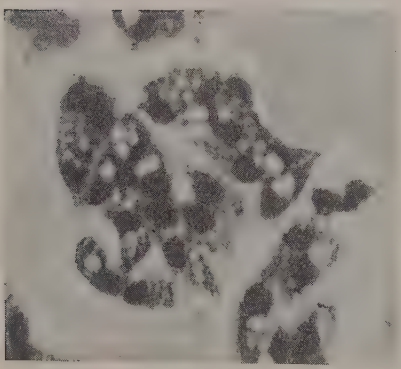
Photographie 4. — Culture HeLa de 48 heures — 72 heures après l'infection avec 10.000 germes. × 100. On observe dans le cytoplasma des élements cellulaires de nombreux germes *(B. pertussis)*. Le tissu chromatinien est très dense, le cytoplasma des cellules étant fréquemment effilé.



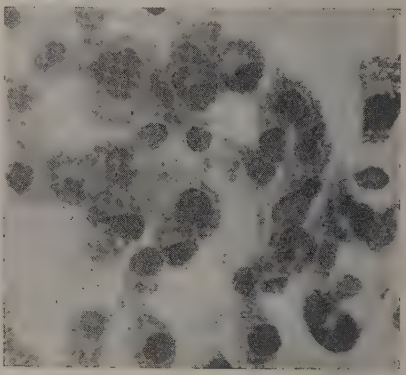
Photographie 5. — Témoin Kb. culture de 120 heures. × 100. Les éléments cellulaires à noyau possèdent un tissu chromatinien fin avec un ou plusieurs nucléoles, de structure non-homogène, avec cytoplasma pâle.



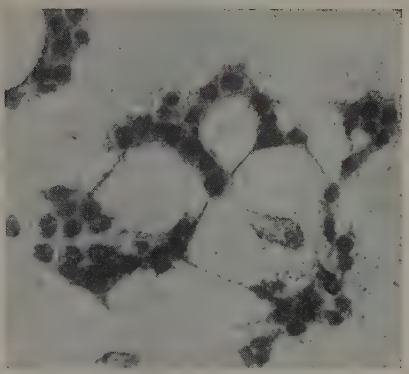
Photographie 6. — Culture Kb. de 48 heures — 24 heures après l'infection avec 250.000 germes. × 100. Le tissu chromatinien est plus dense, quelques éléments ont des noyaux à structure non-homogène. Dans le cytoplasma des éléments cellulaires on observe des germes microbiens *(B. pertussis)*. Le cytoplasma est plus abondant et se colore plus intensément.



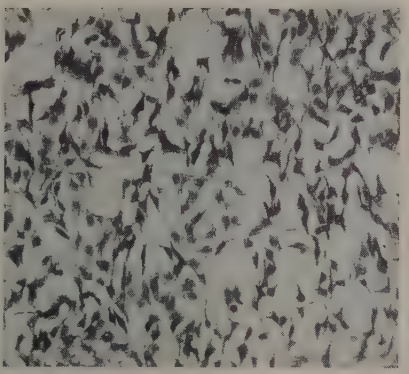
Photographie 7. — Culture Kb de 48 heures — 72 heures après l'infection avec 250.000 germes. × 100. Les altérations cellulaires sont très accentuées; les noyaux sont homogènes, en pycnose et les vacuolisations cytoplasmatiques très nombreuses et souvent de grandes dimensions.



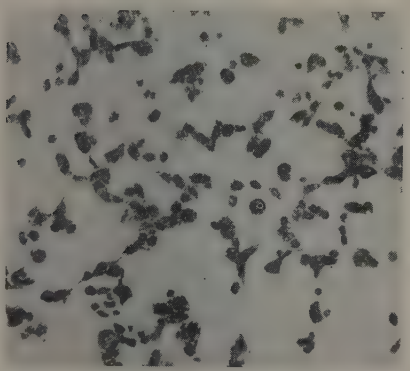
Photographie 8. — Culture Kb. de 48 heures — 72 heures après l'infection avec 50.000 germes. × 100. Les éléments cellulaires présentent des altérations accentuées — épaississement avec homogénité de la structure chromatinienne dans toutes les cellules, le cytoplasma contient de multiples vacuoles de petite dimension dans de nombreuses celulles. Le cytoplasma de toutes les cellules est rempli de germes microbiens *(B. pertussis)*.



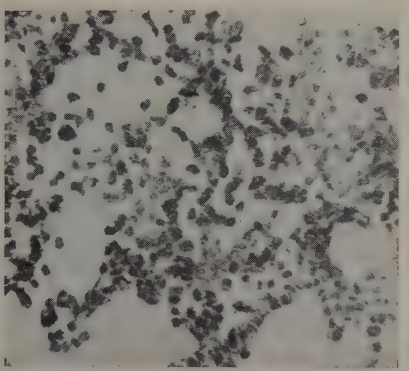
Photographie 9. — Culture Kb de 48 heures — 120 heures après l'infection avec 10.000 germes. × 100. Les modifications nucléaires altératives — épaississement accentué allant jusqu'à la pycnose — sont corrélées avec d'importantes altérations cytoplasmatiques — vacuolisation et effilements prononcés des masses protoplasmatiques.



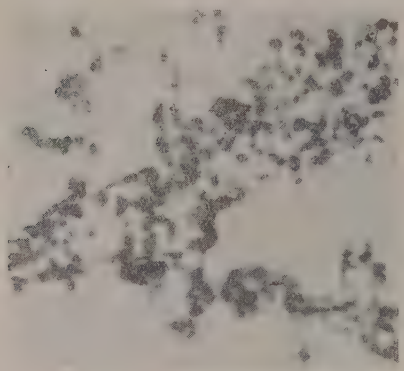
Photographie 10. — Témoin Detroit — 6 — culture de 168 heures (7 jours). × 100. Les éléments cellulaires présentent un tissu chromatinien en réseau fin, avec nucléoles à aspect clair et masses plasmodiales multinucléées. L'aspect du cytoplasma est en général clair et seulement par places on observe un épaississement à affinité tinctoriale accrue. Dans l'ensemble les éléments cellulaires présentent un réseau cellulaire suffisamment dense.



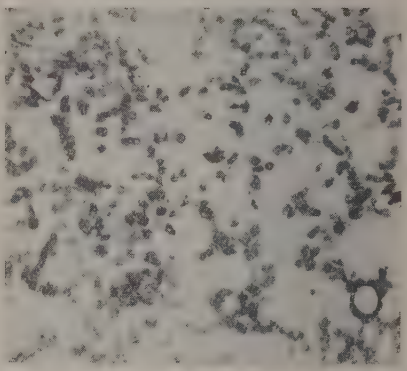
Photographie 11. — Culture Detroit — 6 — de 48 heures — 120 heures après l'infection avec 250.000 germes. × 100. Altérations cellulaires caractérisées par épaississement chromatinien modéré. Dans le cytoplasma, en général à aspect clair, on observe de multiples germes *(B. pertussis)*. Par places les éléments cellulaires présentent un cytoplasma à affinité tinctoriale de beaucoup accrue.



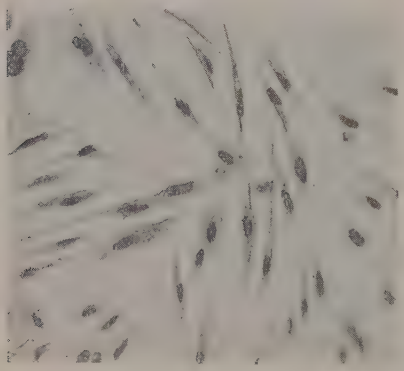
Photographie 12. — Culture Detroit — 6 — de 48 heures — 120 heures après l'infection avec 50.000 germes. × 100. On remarque des altérations cellulaires assez accentuées, caractérisées, d'une part, par différents degrés de lyse nucléo-cytoplasmatique et de condensations nucléaires et tachy-chromasie d'autre part. La densité du réseau cellulaire est encore conservée.



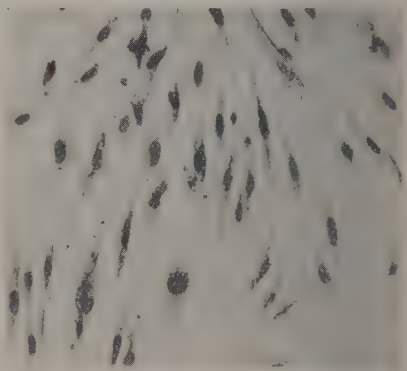
Photographie 13. — Culture Detroit — 6 — de 48 heures — 168 heures après l'infection avec 50.000 germes. × 100. Les éléments cellulaires présentent un degré accentué de pycnose et d'épaississement cytoplasmatique. Une série d'éléments ont l'aspect de lyse cellulaire. Le réseau cellulaire présente des zones étendues, où il est incomplet, ainsi que des effilements cytoplasmatiques.



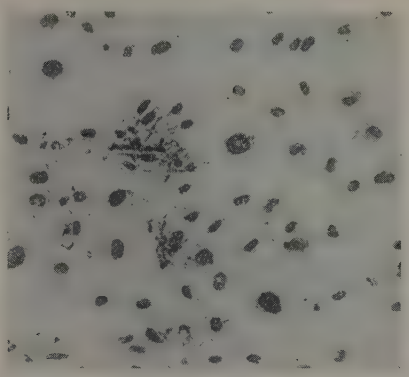
Photographie 14. — Culture Detroit — 6 — de 48 heures — 120 heures après l'infection avec 2.000 germes. × 100. Les altérations cellulaires sont caractérisées par des épaississements du tissu chromatinien; par places on observe des éléments avec noyau en pycnose ainsi que des éléments en lyse nucléo-plasmatique.



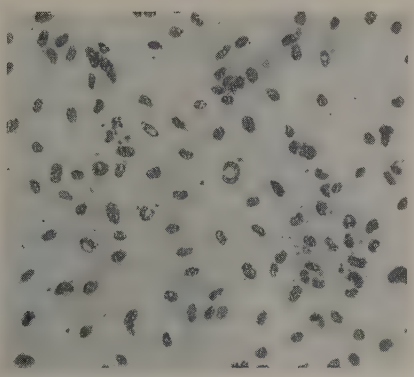
Photographie 15. — Témoin culture d'embryon humain de 216 heures (9 jours) × 100. Les éléments cellulaires présentent un noyau à réseau chromatinien fin avec nucléoles. Certains noyaux sont hypertrophiés. Le cytoplasma a un aspect allongé, parfois effilé. On remarque aussi des éléments cellulaires à deux noyaux.



Photographie 16. — Culture de tissu d'embryon humain de 48 heures — 72 heures après l'infection avec 250.000 germés. × 100. Une série d'éléments cellulaires présentent des vacuolisations cytoplasmatiques et l'homogénéisation du tissu chromatinien.



Photographie 17. — Culture d'embryon humain de 48 heures, — 216 heures (9 jours) après l'infection avec 250.000 germes. × 100. De nombreux éléments cellulaires présentent des vacuolisations nucléaires de dimensions variables; leur aspect structurel est différent: les unes ont un contenu clair, d'autres sont non-homogènes et d'autres encore présentent à l'intérieur des petits fragments nucléaires. Le tissu chromatinien de ces éléments est épaissi.



Photographie 18. — Culture de tissu d'embryon humain de 48 heures, 216 heures (9 jours) après l'infection avec 50.000 germes. × 100. On observe de très fréquentes vacuolisations nucléaires de dimensions variables. Le contenu des vacuoles a un aspect clair chez presque tous les éléments cellulaires. On remarque de fréquentes altérations cellulaires —, épaississement chromatinien et même des aspects de caryorexie.

Dans les tubes contenant les cellules HeLa inoculées avec la *Bordetella pertussis* en concentration progressive, on constate des altérations des élements cellulaires, apparues approximativement 72 heures après l'inoculation, tant pour les concentrations fortes, que pour les concentrations plus faibles.

Ces altérations cellulaires se caractérisent par vacuolisations multiples nucléo-cytoplasmatiques, avec prépondérance cytoplasmatique; le tissu chromatinien est plus dense allant jusqu'à la pycnose, avec cytoplasma pâle et effilé par endroits (Photos 2, 3, 4). A l'intérieur des cellules HeLa on observe de nombreux germes de *B. pertussis;* l'ensemencement, des cultures cellulaires, effectué du milieu nutritif sur milieu Bordet-Gengou, donne des colonies de *B. pertussis*.

2. Les cellules de la souche Kb — normales — présentent un noyaux à tissu chromatinien fin avec un ou plusieurs nucléoles et cytoplasma pâle (Photo 5).

L'inoculation de la *Bordetella* a comme résultat des altérations de plus en plus accentuées: épaississement de la structure chromatinienne allant jusqu'à la pycnose, cytoplasma présentant de nombreuses vacuoles de grande dimension et l'effilement accentué des masses protoplasmatiques. Dans le cytoplasma on observe de nombreux germes de *B. pertussis* (Photo 6, 7, 8) qui, ensemencés sur milieu Bordet-Gengou, donnent des colonies caractéristiques.

Dans tous les tubes, les cellules inoculées ont présenté un cytoplasma plus abondant et une coloration plus intense.

Finalement, on constate une nécrose cellulaire suivie d'une agglomération en masse et le détachement des cellules de la paroi du tube (Photo 9).

Après 48 heures, on observe le début de l'effet cytotoxique dans les tubes contenant une plus grande concentration de germes, effet qui est présent après 72 heures dans tous les tubes.

3. Les cellules de la souche Detroit 6 — normales — ont un réseau chromatinien fin avec des nucléoles à aspect clair, parfois multinucléés; généralement le cytoplasma est clair, présentant par endroits un épaississement avec affinité tinctoriale accrue (Photo 10)

Dans les tubes contenant les cellules de la souche Detroit, inoculées avec la *B. pertussis* en concentration donnée, on remarque des altérations cellulaires de plus en plus accentuées, caractérisées par différents degrés de lyse nucléo-cytoplasmatique ou de condensation nucléaire; le tissu chromatinien s'épaissit, le cytoplasma devenant tachychromatique. Les éléments cellulaires présentent un degré accentué de pycnose cellulaire; dans certaines cellules on constate un noyau en pycnose. Dans le cytoplasma cellulaire on trouve des *B. pertussis* (Photo 11, 12, 13).

Le réseau des éléments cellulaires devient plus rare (Photo 14).

Dans les tubes contenant une plus grande concentration de germes l'effet cytopathogène apparaît le quatrième jour, devenant plus évident le cinquième.

4. Les cellules d'embryon humain — normales — possèdent un noyau avec réseau chromatinien fin et nucléoles. Certains noyaux sont hypertrophiques; le cytoplasma est allongé, parfois effilé. On observe aussi des éléments cellulaires avec deux noyaux. (Photo 15).

Les cellules inoculées présentent un cytoplasma avec vacuolisations multiples, de dimensions variables (Photo 16). Du point de vue aspect, la structure de ces vacuolisations est différente: les unes ont un contenu à aspect clair, les autres sont non-homogènes, d'autres encore contiennent de petits fragments nucléaires dans leur intérieur (Photo 17). On remarque également des altérations cellulaires — épaississement chromatinien et même des aspects de caryorexie (Photo 18).

A remarquer l'absence de développement intracytoplasmatique de la *B. pertussis*; cette absence de développment s'observe également dans le milieu nutritif. Les ensemencements faits à différents intervalles sont restés stériles.

En ce qui concerne la sensibilité des cellules vis-à-vis des germes, on constate, même en présence de très fortes concentrations (2,5 milliards germes/2 ml), l'absence de l'effet cytopathogène après 48—72 heures; 5—6 jours plus tard apparaissent de faibles altérations nucléo-cytoplasmatiques, qui peuvent également apparaître dans les tubes témoins après 12—14 jours.

DISCUSSION

On constate une sensibilité différente des souches cellulaires étudiées par rapport aux concentrations variables des suspensions de *B. pertussis* inoculées. La souche la plus sensible envers la *B. pertussis* a été la souche Kb, suivie par les souches HeLa et Detroit.

Le tissu cellulaire d'embryon humain présente un faible effet cytopathogène, mais seulement en présence de fortes concentrations de germes; certaines de ces altérations, comme par exemple l'apparition des vacuolisations, peuvent être également constatées chez les cellules des tubes témoins, après une plus longue période, mais en proportions plus réduites.

Chez les premiers trois types de souches cellulaires (Kb, HeLa, Detroit) on constate la multiplication intracytoplasmatique de la *B. pertussis* ainsi que son développement dans le milieu nutritif, fait vérifié par les images photographiques et par les cultures obtenues sur milieu Bordet-Gengou. Chez les cellules de tissu embryonnaire humain on observe l'absence de développement des germes dans le cytoplasma cellulaire ainsi que dans le milieu nutritif.

La présence de cellules néoplasiques HeLa représente un support nécessaire à la survie de la *B. pertussis* similaire à celui nécessaire pour son développement dans l'organisme humain, au cours de la maladie.

CONCLUSIONS

On a démontré différents degrés de la sensibilité des souches cellulaires (Kb, HeLa, Detroit-6 et cellules d'embryon humain), étudiées en présence de la *B. pertussis*, manifestés par des altérations nucléo-cytoplasmatiques (effets cytotoxiques).

La souche cellulaire Kb s'est avérée la plus sensible, suivie, par les souches HeLa et Detroit; les cellules embryonnaires humaines se sont montrées presque totalement insensibles.

On observe également que le support des cellules néoplasiques permet le développement intracytoplasmatique de la *B. pertussis*, ainsi que sa multiplication dans le milieu nutritif.

BIBLIOGRAPHIE

1. Shepard, C. C. — J. Exp. Med., 1958, **107**, 237.
2. Heilman, D. H., Howard, D. H. et Carpenter, Ch. M. — J. Exp. Med., 1958, **107**, 319.
3. Crawford G. J. et Fishel W. C. — J. Bact., 1959, **77**, 465.
4. Mesrobeanu I., Georgescu M., Ieremia T. et coll. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 161.
5. Mesrobeanu I., Georgescu M., Ieremia T. et coll. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie., 1960, **19**, 345
6. Aderca I., Janconesco M. et Nachtigal M. — Studii şi Cercetări de Inframicrobiologie, 1959, **10**, 187.

ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ОКАЗЫВАЕМОЕ НА КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ ГеЛа, Кв, ДЕТРОЙТ И НА ТКАНИ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЗАРОДЫША

СООБЩЕНИЕ I.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Авторы установили наличие различной чувствительности у исследованных ими клеточных штаммов в присутствии *B. pertussis*, что проявлялось нуклео-цито плазматическими нарушениями (цитотоксический эффект).

Наиболее чувствительным оказался клеточный штамм Кв, после чего следуют штаммы ГеЛа и Детройт. Клетки человеческого зародыша являются почти полностью нечувствительными. Точно так же, после добавления опухолевых клеток *B. pertussis* развивается внутрицитоплазматически также и в питательной среде.

DIE ZYTOLOGISCHE WIRKUNG VON *BORDETELLA PERTUSSIS* AUF GEWEBEKULTUREN VON HeLa, Kb-, DTROIT UND MENSCHLICHEN EMBRYONÄRZELLEN

I. MITTEILUNG

ZUSAMMENFASSUNG

Es konnte nachgewiesen werden, dass die untersuchten Zellstämme für die Anwesenheit von *B. pertussis* verschiedene Empfindlichkeiten aufweisen. Die Empfindlichkeit äussert sich durch Kern- und Zytoplasmaschädigungen (zytotoxische Wirkung).

Der Kb -Zellstamm ist am empfindlichsten, gefolgt von den Stämmen HeLa und Detroit, während menschliche Embryonärzellen fast vollständig unempfindlich sind. Auch entwickelt sich dank der Tumorzell-grundlage, *B. pertussis* sowohl intrazytoplasmatisch, als auch im Nährboden.

THE CYTOLOGICAL EFFECTS INDUCED BY *BORDETELLA PERTUSSIS* IN HeLa, Kb., DETROIT, AND HUMAN EMBRYONIC TISSUE CULTURES

NOTE I.

SUMMARY

The investigated cell strains were shown to display different susceptibilities to the presence of *B. pertussis*, as expressed by cytotoxic effects consisting in nuclear and cytoplasmic alterations.

The highest susceptibility was displayed by the Kb cell strain, followed by the HeLa and Detroit strains. Human-embryo cells are almost wholly insusceptible. Due to the tumoral cell support, *B. pertussis* develops withtin the cytoplasm as well as in the nutrient medium.

SENSIBILITÉ DES ANOPHÈLES ADULTES AUX INSECTICIDES À EFFET REMANENT, EN ROUMANIE

par

Gh. Lupaşco, Maria Duport, Maria Săndulesco, Aurelia Cristesco, Ileana Combiesco, et Ionela Săndesco *

(Travail effectué dans l'Institut « Dr. I. Cantacuzino », sous la direction du Prof. M. Ciucă, faisant partie du programme des recherches coordonnées par l'OMS.)

— Manuscrit reçu le 10 mars 1961 —

L'évaluation de l'efficacité des insecticides rémanents, en Roumanie, a commencé dès l'introduction sur grande échelle de ces produits dans la lutte antipaludéenne (1948—1949). Les méthodes entomologiques employées les premières années ont été: (a) l'évaluation annuelle des densités anophéliennes dans des localités pulvérisées et non-pulvérisées et (b) l'évaluation de la rémanence par la cage murale. Les données obtenues montraient une moyenne de la rémanence de 4 à 6 mois au DDT 2g/m² et de $2^1/_2$-3 mois au HCH-gamma 0,25-10,30 g/m².

Depuis 1956 pour évaluer la sensibilité des anophèles adultes aux insecticides on a employé la méthode de Busvine-Nash; l'étude était incluse dans le cadre des recherches coordonnées par l'Organisation Mondiale de la Santé. Les tests effectués par deux groupes, la Section d'Entomologie de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino» Bucarest et la Section de Parasitologie de l'Institut d'Hygiène — Iassy ont porté en 1956 sur 22.569 anophèles (traités et témoins) capturés dans 36 localités, en 1957 sur 40.738 anophèles (traités et témoins) capturés dans 24 localités.

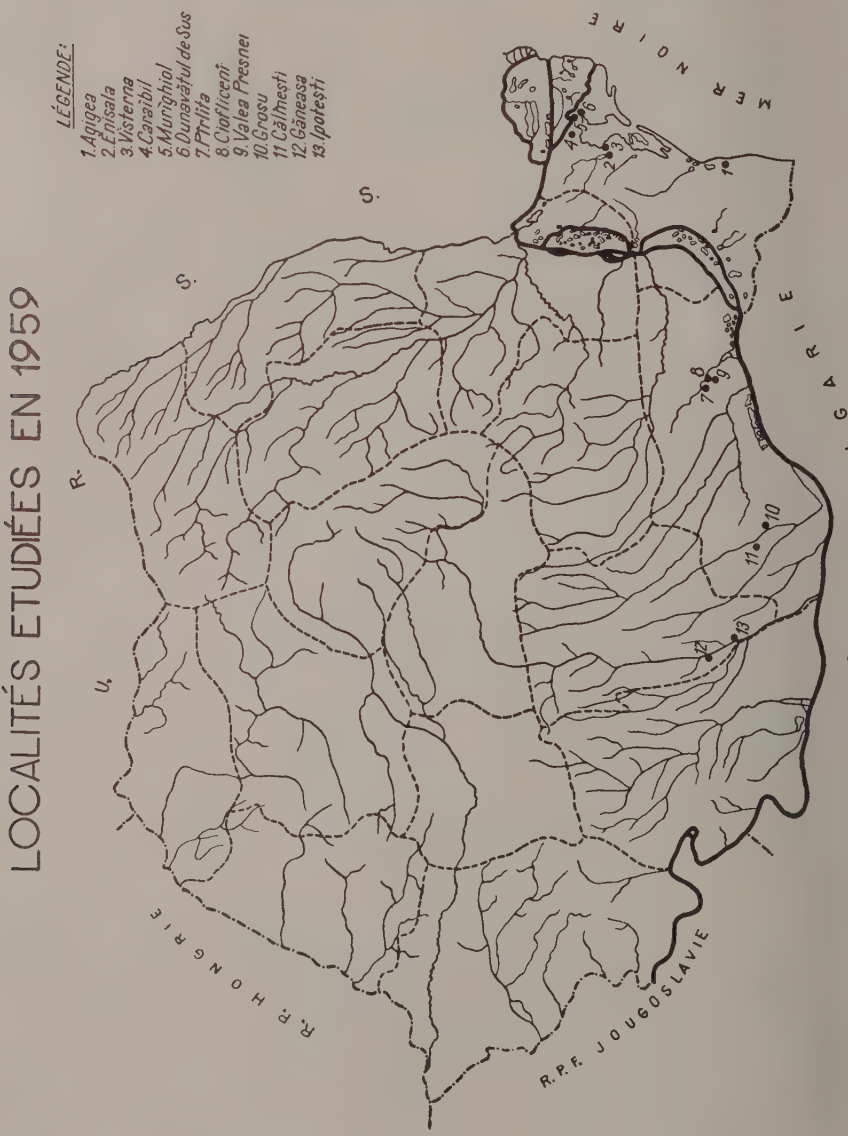
Depuis 1958, les test au DDT et à la dieldrine ont été effectués aussi selon la méthode CMS. En 1958, les entomologistes de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino» ont pratiqué des tests sur 26.941 anophèles (traités et témoins) capturés dans 12 localités.

Les espèces anophélines: *A.m.messeae*, *A.m.typicus*, *A.atroparvus* et *A.sacharovi* ont été soumises au test soit en faune associée, soit en faune pure. Les densités constamment réduites des localités pulvérisées un grand nombre d'années ont obligé de tester dans ce cas un nombre réduit d'anophèles, capturés exclusivement dans les habitations (maisons ou abris pour animaux) neuves ou dans celles non-pulvérisées. Les observations concernant les anophèles adultes et les tests de sensibilité effectués dans l'intervalle 1956—1958 ont fait l'ob-

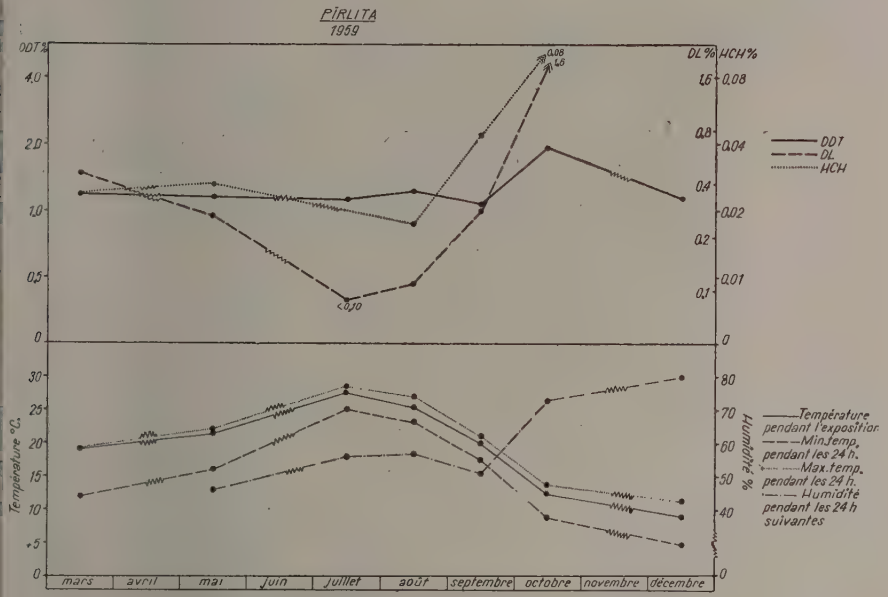
---

* En collaboration avec M. Vişan, O. Firţa, S. Vrabie, entomologistes des Stations antipaludiques.

jet de plusieurs notes présentées à la troisième Conférence des Pays de l'Europe du Sud-Est sur le Paludisme (1958), au Congrès de Paludisme et des Maladies Tropicales à Lisbonne (1958), ou des notes publiées ou miméographiées.



Les tests effectués en 1959 par les entomologistes de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino» ont porté sur 16.698 anophèles (14.452 traités et 2.246 témoins) capturés dans 13 localités ayant une situation différente du point de vue oro-hydrographique et anophélienne. Trois de ces localités: Valea Presnei, Dunavățul de Sus et Murighiol ont été pulvérisées annuellement pendant 10 à 12 années.



Graphique no.1 Variation saisonnière de la CL50

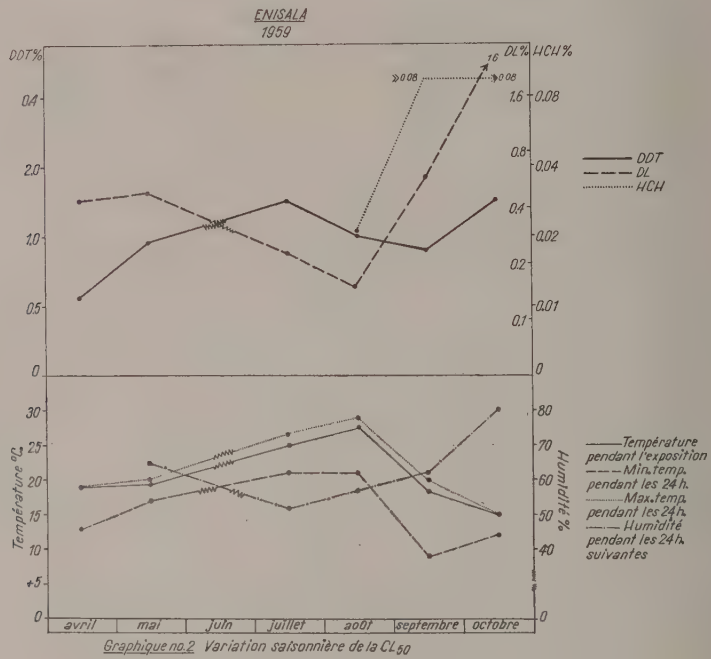
Graphique 1

Dans ces localités, tout comme dans celles pulvérisées la dernière ou les dernières années, on a trouvé un nombre très restreint d'anophèles. De même, on a évalué la sensibilité des anophèles capturés dans 2 localités — Găneasa et Ipotești — situées dans une aire non-pulvérisée et où récemment (1958—1959) on avait signalé des cas de paludisme. Dans trois autre localités — Pîrlita, Enisala, Caraibil — pulvérisées pendant 4 à 5 années et où les opérations imagicides ont été interrompues (au cours des dernières 5 à 7 années) les observations ont eu un caractère de périodicité. La variation saisonnière de la sensibilité aux insecticides évaluée par la CL_{50} calculée (SWAROOP et UEMURA) a été représentée dans les graphiques nr. 1, 2, 3.

Pîrlita. Localité située dans la vallée de Mostiștea a été pulvérisée annuellement par HCH de 1949—1953. La formule anophélienne en 1959 a été représentée par: *A.atroparvus* 50.0%—80.0%, *A.m.messeae* 20.0% — 45.4%; *A.m.typicus* 5.0%—13.6%.

Les données obtenues par les tests de sensibilité (tableau I, graphique 1) montrent que la sensibilité des anophèles adultes au DDT a été presque cons-

tante dans l'intervalle mars - septembre: la CL $_{50}$ la plus réduite a été 1.10% en septembre et la plus grande 1.28% en août. Au mois d'octobre la tolérance a augmenté, la CL $_{50}$ a été 1.95%, phénomène déjà signalé pour le début de l'époque d'hibernation (J. DE ZULUETA, M. CIUCĂ et collab.). En décembre, en plein hiver, les femelles hibernantes ont présenté de nouveau une diminution de la



Graphique no.2 Variation saisonnière de la CL_{50}

Graphique 2

tolérance, la CL $_{50}$—1.20%, valeur égale à celles obtenues pendant la période d'activité hématophage.

Les lignes pour la dieldrine et le HCH-gamma présentent des variations plus grandes. La sensibilité la plus accentuée a été enregistrée en juillet-août, les mois les plus chauds, quand les CL $_{50}$ ont été à la dieldrine $<0{,}10\%$ et $0{,}12^{o}_{o}$ et au HCH-gamma 0.018^{o}_{o}. En septembre, les anophèles ont présenté une légère augmentation de la tolérance pour ces deux insecticides, qui s'est accentuée beaucoup en octobre, quand la CL_{50} à la dieldrine a été $\gg 1.6\%$ et au HCH-gamma $\gg 0.08^{o}_{o}$. Bien qu'en octobre la plupart des anophèles fussent non-gorgés et à corps gras, et les températures beaucoup plus réduites (13° à 15°C pendant l'exposition et 9° à 14°C pendant les 24 heures suivantes) ils ont présenté au DDT une très faible augmentation de la tolérance par rapport aux deux autres insecticides.

Enisala, localité située près du lac Razelm, dans l'aire de distribution d'*A.sacharovi*, a été pulvérisée 5 années: 1949 DDT; 1950, 1951, 1953 HCH; 1954 DDT.

Tests de sensibilité effectués selon les méthodes de l'OMS et Busvine-Nash. Résultat obtenus avec le DDT, la dieldrine et l'HCH-gamma.

Localité	Traitement ou absence de traitement	Espèce (%)			Date	Température pendant l'exposition (°C)	Humidité relative pendant l'exp. (%)	Température pendant les 24h. suivantes (°C)		Méthode de l'OMS — Concentration de DDT dans l'huile non volatile				Témoins	CL_{50} (%)	Méthode de l'OMS — Concentration de dieldrine dans l'huile non volatile					Témoins	CL_{50} (%)	Méthode de Busvine-Nash — Concentration de HCH-gamma dans l'huile non volatile						
		An. repens	An. messeae	An. atroparvus				min.	max.	0.5%	1%	2%	4%			0.1%	0.2%	0.4%	0.8%	1.6%			0.01%	0.02%	0.04%	0.08%		
Pirlita	Traitement. 1949 1952 HCH		45.4	54.5	30.31.III.1959	19		12	19	2.0 (50)	14.0 (50)	84.0 (50)	100 (50)	0 (49)	1.25	0 (50)	16.2 (49)	52.0 (50)	92.0 (50)	96.0 (50)	0 (49)	0.43	0 (43)	14.0 (50)	52.0 (50)	92.0 (50)	96.0 (50)	0 (51)	0.075
					14.V.1959	21.5	46	16	22	4.0 (25)	20.8 (24)	80.0 (25)	100 (25)	4.0 (25)	1.20	8.0 (25)	28.0 (25)	84.0 (25)	84.0 (25)	96.0 (25)	4.0 (25)	0.25	4.0 (25)	24.0 (25)	84.0 (25)	96.0 (25)	100 (25)	4.0 (25)	0.10
		13.6	36.3	50.0	30.VII.1959	27 28	56	25	28.5	22.7 (75)	33.3 (75)	73.3 (75)	94.7 (75)	4.0 (75)	1.18	53.3 (75)	86.7 (75)	94.7 (75)	97.3 (75)		4.0 (75)	0.10	4.0 (75)	30.6 (75)	94.7 (75)	97.3 (75)		4.0 (75)	0.12
		11.5	38.4	50.0	19.20.VIII.1959	25.5	57	13	27	14.1 (99)	35.0 (100)	67.7 (99)	96.0 (100)	4.0 (100)	1.28	26.0 (100)	69.0 (100)	95.0 (100)	100 (100)		4.0 (100)	0.12	17.6 (99)	30.6 (99)	84.4 (99)	100 (100)		4.0 (100)	0.13
		5.0	25.7	69.2	15.IX.1959	20	51	17.5	21	8.0 (75)	48.0 (75)	92.0 (75)	97.3 (75)	2.7 (75)	1.10	17.3 (75)	48.7 (75)	88.7 (75)	82.7 (75)	97.3 (75)	2.7 (75)	0.08	8.0 (75)	14.4 (75)	48.0 (75)	92.0 (75)	97.3 (75)	2.7 (75)	0.08
			20.0	80.0	15.X.1959	13	73	9	14	0 (50)	10.0 (50)	58.0 (50)	86.0 (50)	0 (50)	1.95	0 (25)	0 (25)	4.0 (25)	4.0 (25)	16.0 (25	0 (25)	>1.6	3.3 (30)	3.3 (30)	10.0 (30)	26.6 (30)	0 (30)	> 0.08	
					15.*.X.1959	13	73	9	14							8.0 (50)	14.0 (50)	62.0 (50)	78.0 (50)	86.0 (50)	0 (50)	0.44	13.3 (30)	30.0 (30)	76.6 (30)	86.6 (30)	0 (30)	0.029	
					16.XII.1959	9	80	5	12.5	8.0 (25)	44.0 (25)	80.0 (25)	96.0 (25)	0 (25)	1.20														
Ciofliceni	Traitement: 1955 DDT, 1956 DDT + HCH; 1957—1959 DDT		62.5	37.5	16.IX.1959	20	56	17	18	18.0 (50)	24.0 (50)	76.0 (50)	96.0 (50)	0 (50)	1.29	8.0 (50)	18.0 (50)	48.0 (50)	72.0 (50)	96.0 (50)	0 (50)	0.40							
Valea Presnei	Traitement: 1950 HCH, 1951 DDT + HCH; 1952—1953 HCH, 1954—1958 DDT; 1959 HCH + DDT		50	50	20.VIII.1959	25	44	23	25	32.0 (50)	52.0 (50)	70.0 (50)	98.0 (50)	4.0 (50)	0.86	38.0 (50)	90.0 (50)	96.0 (50)	100 (50)		4.0 (50)	0.11							
					16.IX.1959	21	56	17	18	4.0 (25)	20.0 (25)	96.0 (25)	96.0 (25)	0 (25)	1.20	4.0 (25)	24.0 (25)	44.0 (25)	72.0 (25)	100 (25)	0 (25)	0.34							
Grosu	Traitement: 1953 HCH, 1959 DDT	52.9	5.8	41.2	7.IX.1959	19	62	15	21	14.0 (50)	56.0 (50)	78.0 (50	96.0 (50)	0 (50)	1.05	4.0 (25)	8.0 (25)	56.0 (25)	72.0 (25)		0 (25)	0.43							
Călineşti	Traitement: 1954, 1956—1959 DDT	10.0	70.0	20.0	18.VI.1959	25	58	21	26		14.2 (21)	85.7 (21)		0 (22)	1.40														
Găneasa	Pas de traitement	50.0	40.0	10.0	15.VII.1959	26	58	21	31	10.0 (100)	24.2 (99)	75.0 (100)	100 (100)	1.0 (100)	1.15	15.0 (100)	61.0 (100)	89.9 (100)	100 (100)		1.0 (100)	0.17							
Ipoteşti	Pas de traitement	47.3	26.7	25.9	16.VII.1959	28	59	23	30	6.0 (50)	22.0 (50)	63.3 (49)	96.0 (50	2.0 (50)	1.50	8.0 (50)	84.0 (50)	98.0 (50)	100 (50)		2.0 (50)	0.16							

* Période d'exposition: 4 heures.
Le nombre de moustiques employés pour la détermination de la CL_{50} est indiqué entre parenthèses.

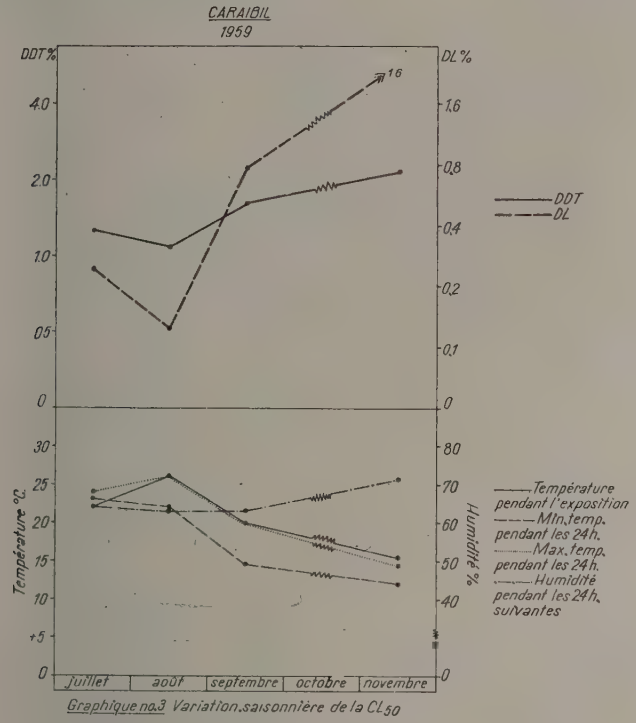
Tests de sensibilité effectués selon les méthodes de l'OMS et de BusvineNash. Résultats obtenus avec le DDT, la dieldrine et HCH-gamma.

Localité	Traitement ou absence de traitement	Espèce (%)				Date	Température pendant l'exposition (°C)	Humidité relative pendant l'exp. (%)	Température pendant les 24 h. suivantes (°C)		Méthode de l'OMS								Témoins		CL_{50} (%)	Methodede l'OMS								Témoins		CL_{50} (%)							
		A. typicus	A. messeae	A. atroparvus	A. sacharovi				min.	max.	Concentration de DDT dans l'huile non volatile											Concentration de dieldrine dans l'huile non volatile											Concentration de HCH-gamma dans l'huile							
											0.5%		1%		2%		4%					0.1%		0.2%		0.4%		0.8%		1.6%				1.01%		0.02%		0.04%		0.08%	
Agigea	Traitement: 1948 / HCH, 1949 / DDT; 1950–53 / HCH, 1954 / DDT	30.0 1.2	20.0 1.2	40.0 41.5	10.0 56.0	26.V.1959 29.VI.1959 14.VIII.1959	19 25 26	70 63 67	17.5 21 25	21 24 26	 14.6 (41)		45.0 (20) 18.0 (50) 26.8 (41)		80.0 (20) 76.0 (50) 52.5 (40)		 92.0 (50) 92.7 (41)		0 (16) 0 (45) 0 (40)		1.10 1.50 1.50	 20.0 (25) 22.5 (40)		 28.0 (25) 55.0 (40)		 92.0 (25) 97.5 (40)		 100 (25) 100 (40)		 100 (25)	0 (25) 0 (40)		0.21 0.18							
Enisala	Traitement: 1949 / DDT, 1950, 1951, 1953 / HCH; 1954 / DDT		72.0 26.3 16.5 5.7 14.5 26.3	 7.2 1.8	27.9 73.6 83.4 94.2 78.2 71.8	17.IV.1959 29.V.1959 2.VII.1959 26/27.VIII.1959 28.IX.1959 30.X.1959 30*.X.1959	19 19.5 25 27,28 18,19 15 15	 65 52 54,59 62 80 80	13 17 21 21 9 12 12	19 20 26.5 28 20 15 15	36.0 (25) 8.0 (125) 26.0 (100) 8.0 (50)		83.3 (24) 43.3 (30) 25.3 (75) 21.6 (125) 52.0 (100) 18.0 (50)		100 (25) 90.0 (30) 73.3 (75) 76.8 (125) 96.0 (100) 76.0 (50)		100 (25) 93.3 (30) 94.7 (75) 97.6 (125) 100 (100) 92.0 (50)		0 (25) 0 (30) 1.3 (75) 0 (125) 2.0 (100) 0 (50)		0.61 0.92 1.50 1.0 0.82 1.50	4.0 (25) 12.0 (75) 16.8 (125) 2.0 (100) 		8.0 (25) 10.0 (30) 29.3 (75) 71.2 (125) 3.0 (100) 0 (25) 0 (25)		28.0 (25) 26.6 (30) 80.0 (75) 98.4 (125) 15.0 (100) 4.0 (25) 40.0 (25)		88.0 (25) 80.0 (30) 100 (75) 100 (125) 47.0 (100) 24.0 (25) 92.0 (25)		100 (25) 100 (75) 93.0 (100) 40.0 (25) 100 (25)	0 (25) 0 (30) 1.3 (75) 0 (125) 2.0 (100) 0 (25) 0 (25)		0.45 0.51 0.22 0.16 0.66 ~1.6 0.51	18.0 (50) 0 (60) 0 (40) 0 (40)		30.0 (50) 0 (60) 0 (40) 0 (40)		90.0 (50) 5.0 (60) 0 (40) 84.6 (39)		100 (50) 20 (60) 17.5 (40) 97.5 (40)		4.0 (50) 0 (60) 0 (40) 0 (40)		0.021 ⩾0.08 ⩾ 0.031
Visterna	Traitement: 1949–50 / DDT; 1953 / HCH		38.6 41.2	 3.2	61.3 55.5	29.IX.1959 31.X.1959	18 14.5	61 75	10 13	15 14	18.0 (50) 4.0 (50)		30.0 (50) 16.0 (50)		86.0 (50) 66.0 (50)		100 (50) 98.0 (50)		0 (50) 0 (50)		1.10 1.50	 		4.0 (50)		6.0 (50)		32.0 (50)		86.0 (50)		0 (50)		0.92							
Caraibil	Traitement: 1950 / DDT, 1951–1953 / HCH; 1954 / DDT		100 100 100 100			4.VII.1959 29.VIII.1959 26.IX.1959 3.XI.1959	22 26 20 15.5	64 63 63 71	23 22 14.5 12	24 26 20 14.5	8.0 (25) 16.0 (50) 6.0 (50) 0 (40)		20.0 (25) 48.0 (50) 6.0 (50) 0 (40)		84.0 (25 74.0 (50) 80.0 (50) 62.5 (40)		96.0 (25) 94.0 (50) 96.0 (50) 97.5 (40)		0 (25) 4.0 (50) 0 (50) 0 (40)		1.32 1.13 1.70 2.10	8.0 (25) 36.0 (50) 2.0 (50) 		12.0 (25) 76.0 (50) 2.0 (50) 0 (25)		60.0 (25) 96.0 (50) 0 (50) 0 (25)		100 (25) 100 (50) 62.0 (50) 0 (25)		 96.0 (50) 20.0 (25)	0 (25) 4.0 (50) 0 (50) 0 (25)		0.26 0.13 0.79 ⩾1.6							
Murghiol	Traitement: 1948–50 / DDT, 1951–53 / HCH; 1954 / DDT, 1955 / HCH; 1956 / DDT, 1957 / DDT + HCH; 1958–59 / DDT		100 100			30.VIII.1959 25.IX.1959	24.5 23	67 70	21 16	25 23	16.0 (50)		20.0 (50) 34.4 (29)		72.0 (50) 82.7 (29)		98.0 (50) 100 (28)		0 (50) 3.7 (27)		1.30 1.30																			
Dunavățul de Sus	Traitement: 1949–50 / DDT, 1951 / DDT + HCH; 1952 / DDT, 1953–1956 / HCH; 1957–1959 / DDT		100 100			31.VIII.1959 25.IX.1959	23 22.5	65 70	11 16	23 23	14.0 (50)		48.0 (50) 24.0 (25)		94.0 (50) 64.0 (25)		100 (50) 100 (25)		0 (50) 0 (28)		0.95 1.50	4.0 (50) 		22.0 (50) 		56.0 (50) 28.0 (25)		100 (50) 72.0 (25)		 		0 (50) 0 (28)		0.20 0.58							

*) Période d'exposition: 4 heures.

Formule anophélienne: en avril *A. messeae* prévalent 72.0%, *A. sacharovi* 7.9% mai—octobre *A. sacharovi* 71.8%—94.2%; *A. m. masseae* 5.7%—26.3%; *.atroparvus* présent seulement en septembre et octobre (au-dessous de 10%).

Les anophèles résiduels ont été très sensibles au DDT en avril (graphique , la CL_{50} a été 0.61%, la plus réduite valeur obtenue en 1959. La CL_{50} la



Graphique 3

lus grande au DDT 1.50% a été obtenue en juillet et octobre, tandis qu'elle vari- t de 0.82% à 1.0% en mai, août et septembre. Les valeurs obtenues à la dieldrine nt été 0.45% et 0.51% en avril et mai, dates après lesquelles la CL_{50} a diminué, n atteignant la valeur la plus réduite 0.16% en août. Au mois de septembre tolérance a augmenté, la CL_{50} a été 0.66% pour atteindre en octobre $> 1.6\%$.)e même, au HCH-gamma (tests effectués en août, septembre et octobre) la CL_{50} plus réduite 0.021% a été obtenue au mois d'août; en septembre les anophè- s ont présenté déjà une grande tolérance, la $CL_{50} \gg 0.08\%$ était presque égale celle obtenue en octobre. Bien qu'au mois d'octobre la plupart des anophèles ıpturés fussent à corps gras, un pourcentage relativement grand pour cette ɔoque 45% étaient récemment gorgés, des *A. sacharovi* qui entrent en hiber- ation plus tard que les autres espèces. Près d'Enisala, dans la même zone,

La variation saisonnière de la sensibilité des

Le mois		CL_{50} (%)											
		Pîrlita		Ciofliceni		Valea Presnei		Grosu		Călineşti		Găneasa	
		1958	1959	1958	1959	1958	1959	1958	1959	1958	1959	1958	1959
Mars	1—15												
	16—31		1.25										
Avril	1—15												
	16—30												
Mai	1—15		1.20										
	16—31	1.80											
Juin	1—15												
	16—30										1.40		
Juillet	1—15												1.15
	16—31	1.70	1.18										
Août	1—15												
	16—31	1.50	1.28				0.86						
Septembre	1—15		1.10						1.05				
	16—30	1.70			1.29		1.20						
Octobre	1—15		1.95										
	16—31	1.70											
Novembre	1—15												
	16—31												
Décembre	1—15	3.0											
	16—31		1.20										

Tableau II

anophèles au DDT. 1958—1959.

CL_{50} (%)													
Ipotești		Agigea		Enisala		Visterna		Caraibil		Murighiol		Dunavățul de Sus	
1958	1959	1958	1959	1958	1959	1958	1959	1958	1959	1958	1959	1958	1959
					0.61								
			1.10	1.20	0.92								
			1.50										
		1.60		1.60	1.50				1.32				
	1.50							2.80					
		1.40	1.50	1.20									
					1.0			1.05	1.13	0.80	1.30	0.96	0.95
		1.30		1.40	0.82	1.30	1.10	2.0	1.70		1.30		1.50
		1.70		0.77	1.50	1.0	1.50						
									2.10				
								3.10					

La variation saisonnière de la sensibilité des

Le mois		CL_{50} (%)									
		Pîrlita		Ciofliceni		Valea Presnei		Grosu		Gănceasa	
		1958	1959	1958	1959	1958	1959	1958	1959	1958	1959
Mars	1—15										
	16—31		0.47								
Avril	1—15										
	16—30										
Mai	1—15		0.28								
	16—31										
Juin	1—15										
	16—30										
Juillet	1—15										0.17
	16—31	0.12	<0.10								
Août	1—15										
	16—31	0.15	0.12				0.11				
Septembre	1—15		0.30						0.43		
	16—30	0.37			0.40		0.34				
Octobre	1—15		⩾1.6 0.44*								
	16—31	>1.6									
Novembre	1—15										
	16—30										
Décembre	1—15	1.65*									
	16—31										

* Période d'exposition: 3 ou 4 heures.

Tableau III

anophèles à la dieldrine. 1958—1959.

CL_{50} (%)											
Ipotești		Agigea		Enisala		Visterna		Caraibil		Dunavățul de Sus	
1958	1959	1958	1959	1958	1959	1958	1959	1958	1959	1958	1959
					0.45						
					0.51						
			0.21								
		0.25		0.15	0.22				0.26		
	0.16							0.23			
		0.21	0.18	<0.10							
					0.16			0.22	0.13		0.20
				0.26	0.66	0.47	0.92	0.79	0.79		0.58
		0.46		0.33	>1.6 0.51*	0.60					
									⩾1.6		
								⩾1.6 >1.6*			

Tableau IV

La variation saisonnière de la sensibilité des anophèles au HCH-gamma. 1958 1959.

Le mois		CL_{50} (%)			
		Pîrlita		Enisala	
		1958	1959	1958	1959
Mars	1—15				
	16—31		0.025		
Avril	1—15				
	16—30				
Mai	1—15		0.028		
	16—31				
Juin	1—15				
	16—30				
Juillet	1—15				
	16—31	0.013			
Août	1—15				
	16—31	0.012	0.018		0.021
Septembre	1—15		0.045		
	16—30	0.026			⩾0.08
Octobre	1—15		⩾0.08 0.028*		
	16—31	⩾0.08 0.028*			⩾0.08 0.03 1*
Novembre	1—15				
	16—30				
Décembre	1—15	⩾0.08 0.043*			
	16—31				

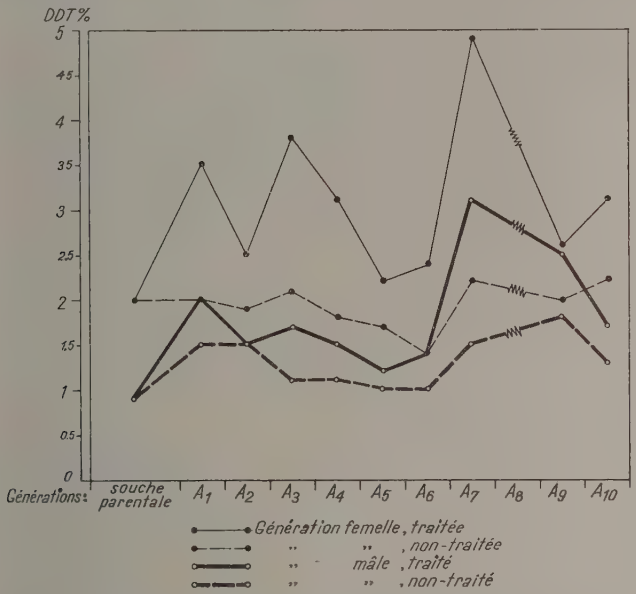
* Période d'exposition: 3 ou 4 heures.

il y a une autre localité (Zebil), à conditions et faune anophéline similaires et où on pratique annuellement des pulvérisations depuis 1949. L'intention d'effectuer des tests comparatifs dans la deuxième localité a échoué, faute d'anophèles nécessaires aux épreuves. *A. sacharovi* de cette aire, comme d'ailleurs sur tout le littoral, par opposition à l'*A. sacharovi* de Grèce (Livadas, Belios, Hadginicolau) et de la Turquie (J. DE ZULUETA) n'a pas acquis une résistance aux insecticides. En plus, il existe d'autres indications qu'*A. sacharovi* est plus délicat, plus fragile que les autres espèces anophélines locales. *A. sacharovi* paraît résister moins en captivité (espace réduit, traumatisme causé par les manipulations ou le transport, action des insecticides etc.).

M. SĂNDULESCO et ST. MAROTINESCO ont montré que sur le littoral (1955) à Agigea, *A. sacharovi* représentait 79,5% de la population quand on examinait les oeufs obtenus par dissections des anophèles moribonds et récemment morts et seulement 33% quand on examinait les oeufs des pontes normales; dans trois autres localités, il était présent dans le premier cas et absent dans le deuxième.

Caraibil, localité située dans la zone du lac Razelm et près du Delta du Danube, a été pulvérisée 5 années: 1950 DDT; 1951—1953 HCH; 1954 DDT. La faune ano-

phéline en 1957—1959 a été représentée par *A.m. messeae* 100%. La plus grande sensibilité des anophèles au DDT a été enregistrée en juillet et août, quand les valeura des CL_{50} ont été 1.32% et 1.13% (graphique 3). En septembre (l'époque de préhibernation avance d'un mois presque pour *A. m. messeae)*, la valeur de la CL_{50} a présenté une légère augmentation 1.70% pour qu'elle soit 2.10% au début de novembre.



Graphique no 4 Variation de la CL_{50} chez A.atroparvus, générations successives traitées avec DDT et non-traitées

Graphique 4

Les résultats obtenus à la dieldrine montrent la sensibilité la plus grande, la CL_{50} 0.13% en août. En septembre la tolérance a augmenté, la CL_{50} 0.70% et en novembre encore plus $\gg$ 1.6%.

En comparant les valeurs obtenues en 1959 dans les localités de la même aire, celles où l'on a interrompu les pulvérisations les dernières 5 à 7 années par rapport à celles où on pulvérise depuis 10—12 années, il ressort des différences assez insignifiantes qui, même si elles n'aboutissent pas à une explication exacte, indiquent en tout cas l'absence d'une résistance acquise. Ainsi en août la CL_{50} au DDT à Pîrlita (pulvérisation interrompue) a été 1.28% et à Valea Presnei (pulvérisée annuellement) 0.80%; à Caraibil (pulvérisation interrompue) en août 1.13%, en septembre 1.70% et à Dunavățul de Sus (pulvérisé annuellement) 0.95% et 1.50%.

Les observations effectuées deux années de suite (1958—1959) dans les localités pulvérisées annuellement, indiquent des niveaux de sensibilité pratiquemnet

Tests de sensibilité. Résultats obtenus chez des *A. atroparvus*

Date	Génération	Âge	Température pendant l'exposition (°C.)	Température pendant les 24 heures suivantes (°C.)	Con 0.5% No. d'insectes testés	Con 0.5% No. d'insectes morts
4.1—7.2.1959	S.p. *	1—4 jours	24°—28.5°	22°—30°	25	1
3.3—16.3	A^1	1—4 »	24°—29°	23.5°—30°	—	—
3.4—23.4	A^2	1—3 »	25°—28.5°	24.5°—32.5°	39	0
12.5—29.5	A^3	2—3 »	24.5°—27.5°	21.5°—29.5°	—	—
29.6—13.7	A^4	2—3 »	23.5°—26°	23°—28°	—	—
12.8—18.8	A^5	2—3 »	25.5°—26°	23°—27°	27	1
17.9—28.9	A^6	2—3 »	23.5°—26.5°	24°—28.5°	—	—
13.10—23.10.	A^7	2—3 »	27°—28°	25.5°—32°	—	—
—	A^8	—	—	—	—	—
6.12—20.12.	A^9	2—3 »	25°—28°	24°—30.5°	18	0
18.1—28.1.1960	A^{10}	2—3 »	22.5°—26.5°	21.5°—33°	43	0

Non traitées

4.1—7.2.1959	S.p. *	1—4 jours	24°—28.5°	22°—30°	25	1
19.2—3.3	A^1	2—5 »	26°—26.5°	23°—27°	20	2
20.3—1.4.	A^2	1—4 »	26°—27.5°	24°—31°	24	2
1.5—12.5.	A^3	2—4 »	25°—28°	23°—30°	23	0
18.6—3.7.	A^4	2—3 »	23.5°—26.5°	23°—29°	—	—
7.8—14.8	A^5	2—3 »	24°—26.5°	23°—27°	24	1
17.9—28.9.	A^6	2—3 »	23.5°—26.5°	24°—28.5°	—	—
13.10—27.10.	A^7	2—3 »	26.5°—28.5°	25.5°—32°	17	3
—	A^8	—	—	—	—	—
13.12—28.12.	A^9	2—3 »	25°—26°	24°—30.5°	22	1
18.1—28.1.1960	A^{10}	2—3 »	23.5°—27°	21.5°—33°	48	0

* S.p. = Souche parentale.

Tableau V

femelles dans des générations successives, traitées par le DDT:

centration de DDT dans l'huile non volatile													
	1.0%			2.0%			4.0%			Témoins			
Taux de mortalité	No. d'insectes testés	No. d'insectes morts	Taux de mortalité	No. d'insectes testés	No. d'insectes morts	Taux de mortalité	No. d'insectes testés	No. d'insectes morts	Taux de mortalité	No. d'insectes testés	No. d'insectes morts	Taux de mortalité	CL_{50} de DDT (%)
4.0	133	26	19.5	240	115	47.9	166	138	83.1	175	0	0	2.0
—	—	—	—	86	28	32.5	37	20	54.0	46	0	0	3.5
0	72	3	4.2	201	99	49.2	93	65	69.9	137	0	0	2.5
—	108	3	2.8	268	59	22.0	142	69	48.6	150	0	0	3.8
—	123	1	0.8	179	43	24.0	128	83	64.8	89	0	0	3.1
3.7	44	5	11.4	122	52	42.6	57	48	84.2	43	0	0	2.2
—	13	1	7.7	61	19	31.1	34	30	88.2	24	0	0	2.4
—	30	0	0	79	5	6.3	19	6	31.6	30	0	0	4.9
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	37	2	0.8	92	30	32.6	52	41	78.8	39	0	0	2.6
0	81	4	4.9	133	28	21.0	103	70	68.0	74	0	0	3.1

(témoins):

4.0	133	26	19.5	240	115	47.9	166	138	83.1	175	0	0	2.0
10.0	107	19	17.7	131	54	41.2	135	110	81.5	118	0	0	2.0
8.3	82	24	29.3	174	84	48.3	123	98	79.7	97	1	0.5	1.9
0	52	2	3.8	52	24	64.1	57	47	82.4	69	0	0	2.1
—	61	7	11.4	80	44	55.0	78	58	74.3	60	0	0	1.8
4.2	60	6	10.0	61	38	62.3	64	61	95.3	61	0	0	1.7
—	38	17	44.7	54	30	55.5	54	48	88.9	38	0	0	1.4
17.6	39	6	15.4	54	22	42.6	49	37	75.5	30	0	0	2.2
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-
0.8	81	10	12.3	93	56	60.2	83	68	81.9	60	0	0	2.0
0	75	3	4.0	88	33	37.5	86	79	91.9	46	0	0	2.2

Tests de sensibilité. Résultats obtenus chez des *A. atroparvus*

Date	Génération	Âge	Température		Concen		
			pendant l'exposition (°C.)	pendant les 24 heures suivantes (°C.)	0.25%		
					No. d'insectes testés	No. d'insectes morts	Taux de mortalité
4.1—7.2.1959	S.p.*	1—4 jours	24°—28.5°	22°—29°	39	2	5.1
3.3—16.3	A¹	1—4 »	24°—29°	23.5°—30°	—	—	—
6.4—23.4	A²	1—3 »	25°—28.5°	24.5°—32.5°	—	—	—
12.5—29.5.	A³	2—3 »	24.5°—27.5°	21.5°—29.5°	—	—	—
29.6—13.7.	A⁴	2—3 »	23.5°—26°	23°—28°	—	—	—
12.8—18.8.	A⁵	2—3 »	25.5°—26°	23°—27°	—	—	—
17.9—28.9.	A⁶	2—3 »	23.5°—26.5°	24°—28.5°	—	—	—
13.10—27.10.	A⁷	2—3 »	26.5°—28°	26°—32°	—	—	—
—	A⁸	—	—	—	—	—	—
6.12—20.12.	A⁹	2—3 »	25°—28°	24°—30.5°	—	—	—
18.1—28.1.1960	A¹⁰	2—3 »	22.5°—26.5°	21.5°—33°	—	—	—

Non traitées

24.1—7.2.1959	S.p.*	1—4 jours	24°—28.5°	22°—29°	39	2	5.1
27.2—3.3.	A¹	2 »	24°—26.5°	23°—27°	—	—	—
20.3—1.4.	A²	1—4 »	26.5°—27.5°	24°—31°	—	—	—
1.5—12.5	A³	2—3 »	25°—28°	23°—30°	—	—	—
18.6—3.7.	A⁴	2—3 »	23.5°—26.5°	23°—29°	—	—	—
7.8—14.8.	A⁵	2—3 »	24°—26.5°	23°—27°	—	—	—
17.9—28.9.	A⁶	2—3 »	23.5°—26.5°	24°—28.5°	—	—	—
13.10—27.10.	A⁷	2—3 »	26.5°—28°	25.5°—32°	—	—	—
—	A⁸	—	—	—	—	—	—
13.12—28.12.	A⁹	2—3 »	25°—26°	24°—30.5°	—	—	—
18.1—28.1.1960	A¹⁰	2—3 »	23.5°—27°	21.5°—33°	—	—	—

S.p. = Souche parentale.

Tableau VI

mâles dans des générations successives, traitées par le DDT:

tration de DDT dans l'huile non volatile															
0.5%			1.0%			2.0%			4.0%			Témoins			CL_{50} de DDT (%)
No. d'insectes testés	No. d'insectes morts	Taux de mortalité	No. d'insectes testés	No. d'insectes morts	Taux de mortalité	No. d'insectes testés	No. d'insectes morts	Taux de mortalité	No. d'insectes testés	No. d'insectes morts	Taux de mortalité	No. d'insectes testés	No. d'insectes morts	Taux de mortalité	
77	13	16.9	138	57	41.3	42	36	85.7	—	—	—	131	5	3.8	0.9
—	—	—	80	21	26.2	28	14	50.0	—	—	—	54	1	1.8	2.0
—	—	—	189	55	29.1	131	85	64.9	63	61	96.8	133	1	0.7	1.5
18	0	0	196	35	17.8	116	85	73.3	73	70	95.9	127	1	0.8	1.7
23	1	4.3	143	43	30.1	128	87	68.0	95	89	93.7	80	0	0	1.5
47	2	4.2	50	13	26.0	42	31	73.8	32	32	100	46	0	0	1.2
—	—	—	42	19	45.2	23	17	73.9	12	12	100	18	1	5.5	1.4
22	0	0	61	8	13.1	36	10	27.8	29	18	62.1	34	2	5.9	3.1
—		—	—	—	—	—	-		—			-	—	—	—
8	0	0	57	6	10.5	26	11	42.3	17	13	76.5	37	1	2.7	2.5
41	0	0	128	33	25.8	96	73	76.0	69	67	97.1	57	0	0	1.5

(témoins):

77	13	16.9	138	57	41.3	42	36	85.7	—	—	—	131	5	3.8	0.9
25	3	12.0	66	11	16.6	75	48	64.0	25	23	92.0	53	2	3.7	1.5
44	5	11.4	99	34	34.3	71	44	62.0	17	14	82.3	97	2	2.1	1.5
25	1	4.0	67	20	29.8	36	31	86.1	25	25	100	68	0	0	1.1
—	—	—	59	34	57.6	55	47	85.4	50	50	100	48	1	2.1	1.1
40	5	12.5	67	31	46.3	59	54	91.5	20	20	100	64	1	1.6	1.0
11	1	9.1	45	24	53.3	25	19	76.0	28	28	100	34	0	0	1.0
—	—	—	40	15	37.5	38	22	57.9	26	20	76.9	34	0	0	1.5
—	-	—	-		—	—	—	—	-	—	-	-	—	—	—
—	—	—	58	21	36.2	56	23	41.1	51	47	92.1	41	0	0	1.8
—	—	—	73	20	27.4	86	70	81.4	63	63	100	37	1	2.7	1.3

égaux (Tableaux II, III, IV). Les différences des CL_{50} qui existent sont probablement dues en grande partie à une série de facteurs parmi lesquels on peut compter: la variation de la température, de l'humidité, de l'état physiologique et de l'âge des femelles en expérience. Bien que le groupement mensuel des résultats soit assez artificiel, il ressort pourtant que les anophèles résiduels au printemps et les générations successives jusqu'en automne ont été assez sensibles au DDT. L'augmentation de la tolérance à cet insecticide s'est produite en octobre, début de l'époque d'hibernation des anophèles; les CL_{50} ont été jusqu'à doubler ou à tripler par rapport aux valeurs les plus réduites obtenues pendant la même année.

Les anophèles ont présenté à la dieldrine et au HCH-gamma une grande sensibilité pendant un intervalle plus court, juin — août, les mois les plus chauds. Une augmentation de la tolérance a été enregistrée dès septembre, un mois plus tôt que pour le DDT, quand en général les anophèles se gorgeaient et l'on signalait l'apparition du corps gras, mais pas en grand pourcentage. L'augmentation de la tolérance constatée en octobre à ces deux insecticides a été dix fois plus grande, ou même plus, par rapport aux valeurs obtenues en juin — août. L'avancement de l'augmentation de la tolérance d'un mois par rapport à la date respective pour le DDT, paraît mettre en corrélation ce phénomène non seulement avec l'état de préhibernation mais aussi avec la baisse de la température. Ce fait pourrait aussi aider — dans une certaine mesure — à expliquer les résultats obtenus à la dieldrine et au HCH-gamma en mars — avril, CL_{50} 2 à 5 fois plus grande par rapport aux valeurs les plus réduites obtenues, période pendant laquelle la sensibilité au DDT a été similaire à celle enregistrée en été.

Recherches de laboratoire. A l'intention d'obtenir une souche résistante aux insecticides on a traité au DDT des générations successives d'*A. atroparvus* adultes, provenant d'une seule femelle, capturée dans une localité non-pulvérisée. On a continué l'élevage en générations successives des adultes survivants au DDT 2% (femelles) et DDT 1% (mâles), dont l'exposition à l'insecticide s'est faite selon la méthode de l'O. M. S. pour les adultes. Les tests ont porté sur des anophèles âgés de 1 à 4 jours, qui avaient préalablement reçu une solution d'eau sucrée. Parallèlement on a évalué la sensibilité des témoins, générations successives non-traitées, séparées dès le début de la souche parentale (Les données obtenues ont été enregistrées dans les tableaux V, VI et représentées dans le graphique 4).

Résultats. Il faut tenir compte dès le commencement que les conditions des chambres d'élevage ne sont pas standardisées (température inconstante et illumination naturelle des larves variable). Ces conditions pourraient expliquer partiellement les variations de sensibilité assez grandes de la souche non-traitée — les témoins — dont les résultats devraient servir finalement à corriger ceux obtenus pour la souche traitée.

L'exposition au DDT de 7 générations successives d'*A. atroparvus* adultes, s'est reflétée par une certaine modification de la tolérance. La ligne (graphique 4) des CL_{50} obtenues pour la série des femelles traitées présente des oscillations qui se maintiennent toujours au-dessus des valeurs respectives de la série des femelles non-traitées. En ce qui concerne la série des mâles, les variations sont plus réduites.

Les CL_{50} de la septième génération traitée, mâles et femelles, ont doublé par rapport aux générations respectives non-traitées: mâles 3.1% (traités), 1.5% (non-traités); femelles 4.9% (traitées) et 2.2% (non-traitées).

L'interruption du traitement de la huitième génération paraît avoir diminué la tolérance, particulièrement celle des femelles, dont la CL_{50} a été 4.9% pour la septième génération et 2.6% pour la neuvième génération.

La sensibilité des générations femelles traitées par le DDT et non-traitées a été inférieure à celle des générations mâles respectives.

CONCLUSIONS

Les résultats des observations et tests effectués sur les anophèles adultes capturés sur le terrain ont montré les faits suivants:

— Les anophèles vecteurs des zones pulvérisées 10 à 12 années n'ont pas acquis une résistance physiologique aux insecticides; l'observation est confirmée par l'absence des cas de paludisme dans ces localités et par la sensibilité aux insecticides pratiquement égale des anophèles capturés dans des localités pulvérisées un nombre variable d'années et de celles non-pulvérisées.

— Les variations saisonnières des CL_{50} font ressortir que la sensibilité au DDT a présenté peu d'oscillations pendant l'intervalle mars-septembre. Au mois d'octobre, la tolérance a augmenté deux ou trois fois par rapport aux valeurs les plus réduites de la même année.

— La sensibilité la plus marquée à la dieldrine a été constatée pendant les mois les plus chauds, juin — août. Au printemps, les CL_{50} ont été 2 à 5 fois plus grandes et en automne dix fois plus grandes et même plus qu'en été.

— La ligne de la variation saisonnière de la sensibilité au HCH-gamma a présenté la même tendance que celle de la dieldrine.

— Les différences d'intensité et de durée de la sensibilité et de la tolérance pourraient être le résultat de plusieurs facteurs (température, corps gras etc.) qui agissent différemment sur le mécanisme d'intoxication et de désintoxication par ces trois insecticides.

Le fait que dans les aires traitées aux insecticides pendant plusieurs années de suite on constate des densités anophéliennes réduites, ainsi que l'absence totale des cas de paludisme, confirment le maintien de la sensibilité des anophèles-vecteurs aux insecticides sur tout le territoire de la R.P. Roumaine et donc la possibilité de continuer à employer la méthode imagicide dans le complexe des mesures préconisées en vue de l'éradication du paludisme.

Les recherches de laboratoire sur *A. atroparvus* (adultes) traité en générations successives au DDT, ont indiqué une augmentation de la tolérance qui a été jusqu'à doubler pour les mâles et les femelles de la septième génération traitée par rapport aux générations respectives de la souche non-traitée.

L'interruption de l'action de l'insecticide à la huitième génération paraît avoir déterminé une diminution de la tolérance qui a été plus accentuée pour les femelles.

BIBLIOGRAPHIE

1. Belios G.D. et Fameliaris G. — Bull. Org. Mond. Santé, 1956 **15,** 415
2. Brown A.W.A. — Org. Mond. Santé, Monographie, 1958, nr. 38
3. Ciucă M. — Bull. Org. Mond. Santé, 1956, **15,** 725
4. Ciucă M., Ungureanu E., Duport M., Săndulescu M. et coll. — WHO/Mal/1957, 190
5. Davidson — G. Bull. Org. Mond. Santé, 1958, **18,** 579
6. Duport M. et Săndulesco M. avec la collab. Cristesco A., Combiesco I., Athanasiu A., Săndesco I., Marotinesco S., Gheorghiu S. et Subota C. — Bull. Org. Mond. Santé, 1958 **19,** 1112
7. Duport M. et Săndulesco, M. — Org. Mond. Santé Euro- 107/WP 9 1958
8. Livadas G.A. et Georgopoulos G. — Bull. Org. Mond. Santé, 1953, **8,** 497
9. Săndulesco M., Marotinesco St. — Arch. Roum. de Pathol. Expér., 1957, **16,** 144
10. Swaroop S. et Uemura K. — Bull. Org. Mond. Santé, 1957 **17,** 439
11. Ungureanu E., Duport M. et Săndulescou M. — Indian J. Malariology 1958, **15,** 601
12. Zulueta J. de, Jolivet P., Thymakis H. et Caprari P. — Bull. Org. Mond. Santé, 1957, **16,** 475
13. Zulueta J. de. — Bull. Org. Mond. Santé, 1959, **20,** 797

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВЗРОСЛЫХ КОМАРОВ АНОФЕЛЕС К РЕМАНЕНТНЫМ ИНСЕКТИЦИДАМ В РУМЫНИИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Результаты наблюдений, а также и тестов, осуществленных в отношении выловленных на местах взрослых комаров анофелес, показали следующее:

Комары анофелес — переносчики малярии в местностях подвергшихся пульверизации в течении 10—12 лет, не приобрели физиологической резистентности к инсектицидным препаратам. Это наблюдение подтверждается отсутствием малярии в этих местностях, а также практически одинаковой чувствительностью к инсектицидам у комаров анофелес, выловленных в местностях подвергавшихся пульверизации в течение различного ряда лет, а также и в местностях, не подвергшихся пульверизации.

— Сезонные вариации CI_{50} указывают, что чувствительность к ДДТ представляет небольшие колебания в промежутке периода времени март-сентябрь. В октябре, переносимость оказалась повышенной в 2—3 раза по сравнению с меньшими значениями этого же сезона.

— Более выраженная чувствительность к препарату диэлдрин была установлена в наиболее теплые месяцы: июнь-июль. Весной, CI_{50} были в 5 раз большими, а осенью — в 10 и больше раз большими чем летом.

— Кривой сезонных изменений чувствительности к гамма-HCH отмечаются те же изменения, как и в отношении диэлдрина.

— Разница в интенсивности и продолжительности чувствительности, а также и переносимости, может быть результатом действия также и многих других факторов (температура, жировое тело и т.д.), которые различным образом влияют на механизм интоксикации и дезинтоксикации этими 3 инсектицидными препаратами.

То обстоятельство, что в 3 областях, подвергавшихся ежегодно пульверизации инсектицидными препаратами в течение ряда лет, отмечается меньшая плотность популяций комаров-анофелес, а также и полное отсутствие случаев малярии позволяет авторам говорить о наличии сохранения чувствительности к инсектицидам у комаров анофелес — переносчиков малярии — на всей территории Румынии и, следовательно, о возможности продолжать применение имагоцидного метода в комплексе мероприятий, предложенных в целях искоренения малярии.

Лабораторные исследования взрослых экземпляров анофелес-атропарвус, подвергшихся действию ДДТ в последующих поколениях, указали на повышение переносимости, которая удвоилась у комаров женского и мужского пола 7-го поколения по сравнению с последующими поколениями штаммов, не подвергшихся этому действию.

Прекращение действия инсектицида, начиная с 8-го поколения, повидимому, вызвало снижение переносимости, что особенно было выражено у женских особей.

DIE EMPFINDLICHKEIT ERWACHSENER ANOPHELES FÜR INSEKTIZIDE MIT PERSISTIERENDER WIRKUNG IN RUMÄNIEN

ZUSAMMENFASSUNG

Beobachtungen und Teste an erwachsenen, im Freien gesammelten Anopheles führten zu folgenden Ergebnissen:

— Übertragende Anopheles aus Gebieten, in welchen während einer Zeitspanne von 10—12 Jahren Zerstäubungen durchgeführt worden waren, haben keine physiologische Widerstandsfähigkeit gegen Insektizide erworben. Diese Beobachtung wird durch die Abwesenheit von Malariafällen in diesen Ortschaften sowie durch die praktisch gleiche Empfindlichkeit für Insektizide bei Anopheles aus Ortschaften, die während verschiedener Zeitabschnitte der Zerstäubung unterworfen worden waren und solchen, die in nicht derartig behandelten Ortschaften gesammelt wurden bestätigt.

— Aus den jahreszeitlichen Schwankungen der CL_{50} geht hervor, dass die Empfindlichkeit für DDT im Zeitabschnitt März-September nur geringe Veränderungen aufwies. Im Oktober stieg die Verträglichkeit, im Vergleich zu den geringeren Werten der gleichen Periode, um das 2—3fache an.

— Eine ausgeprägtere Empfindlichkeit für Dieldrin wurde während der wärmeren Monate (Juni—Juli) festgestellt. Im Frühjahr waren die CL_{50} 2—5 mal und im Herbst 10mal und mehr als 10mal höher als im Sommer.

— Die Kurve der jahreszeitlichen Schwankungen der Empfindlichkeit für HCH- gamma wies die gleichen Tendenzen auf wie die des Dieldrins.

— Die Verschiedenheiten der Intensität und Dauer der Empfindlichkeit und Toleranz könnten das Ergebnis mehrerer Faktoren sein (Temperatur, Fettstoff, usw.), die auf die Vergiftungs- und Entgiftungsmechanismen bei den verschiedenen Insektiziden verschieden einwirken.

Die Tatsache, dass in den drei während mehrerer aufeinanderfolgender Jahre mit Insektiziden behandelten Gebieten geringe Anophelesdichten verzeichnet wurden sowie die vollkommene Abwesenheit von Malariafällen gestatten die Behauptung, dass die übertragenden Anopheles ihre Empfindlichkeit für Insektizide in ganz Rumänien bewahrt haben und dass daher die Möglichkeit zur Fortführung der imagiziden Methode im Rahmen des Massnahmenkomplexes zur Ausrottung der Malaria gegeben ist.

Laboratoriumsuntersuchungen über erwachsene Exemplare von *A. atroparvus*, die während mehrerer aufeinanderfolgender Generationen mit DDT behandelt wurden, ergaben, dass eine Erhöhung der Toleranz stattgefunden hatte. Im Vergleich mit den entsprechenden Generationen des unbehandelten Stammes, erreichte diese bei den Männchen und Weibchen der 7. behandelten Generation das doppelte.

Unterbrechung der Einwirkung des Insektizids in der 8. Generation scheint ein Absinken der Toleranz hervorgerufen zu haben, das bei Weibchen ausgeprägter war.

THE SUSCEPTIBILITY TO INSECTICIDES WITH REMANENT EFFECTS OF ADULT ANOPHELES IN RUMANIA

SUMMARY

Observations and tests performed in adult Anopheles captured in the field have resulted in the following findings:

— Vector anopheles from areas which had been sprayed for 10—12 years did not acquire physiological resistance to insecticides. This observation is confirmed by the absence of malaria cases in the respective places and by the fact that anopheles captured in localities which had been sprayed for various periods of years practically displayed the same susceptibility as those captured in places where no spraying had been performed.

— As regards seasonal variations of the CL_{50}, the susceptibility to DDT may be seen to have varied little during the March-September interval. In October, the tolerance increased by 2—3 times, as compared to the lower figures recorded for the same period.

— A more marked susceptibility to dieldrine was recorded during the warm months (June—July). The CL_{50} were by 2—5 times higher in spring and by 10 or more times higher in autumn than in summer.

— Seasonal variations of susceptibility to HCH-gamma displayed the same trend as those of susceptibility to dieldrine.

— The differences in the intensity and duration of susceptibility and tolerance might be the result of several factors (temperature, fat, etc.) which are exerting different actions on the mechanismus of intoxication and disintoxication by the three insecticides.

Since in the three areas subjected to insecticide treatment for several years running the incidence of anopheles was found to be low and the incidence of malaria was nil, it may be stated that the vector anopheles have maintained their susceptibility to insecticides throughout the whole Rumanian territory. Hence, the continued use of the imagicidal method within the complex of steps aiming at the eradication of malaria is justified.

Laboratory investigations on *A. atroparvus* exposed to DDT in the adult stage and during successive generations, revealed an increase of tolerance to occur, which in the males and females of the 7th generation treated was almost twofold that of the respective generation in the untreated strain.

Discontinuance of exposure to the insecticide in the 8th generation appears to have resulted in a decrease of tolerance, which was more marked in females.

RECHERCHES SUR LES SYSTÈMES PHAGO-BACTÉRIENS CHEZ LES *MYCOBACTÉRIES* SAPROPHYTES ET PATHOGÈNES

par

G. Eustatziou, Silvia Eustatziou, Eugenia Meitert, Maria Antohi et Viorica Bogdănesco

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Cultures Microbiennes)

— Manuscrit reçu le 1-er mars 1961 —

Dans un travail antérieur (1) nous avons étudié 39 souches de Mycobactéries saprophytes et 15 souches de Mycobactéries atypiques du point de vue caractères morphologiques, culturels, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques. En adoptant le schéma de Gordon et Smith (2, 3) qui comprend les espèces : *phlei*, *smegmatis*, *fortuitum* et, finalement (1959) *rhodochrous* (4), nous avons réussi à encadrer: 79,5% des souches dans les 3 premières espèces sus-citées, 15,3% *(Myc. pellegrini)*, dans un groupe ressemblant à l'espèce *rhodochrous* (Gordon et coll.); 5,10% des souches *(Myc. thamnopheos, Myc. battaglini)* n'ont pu être encadrées dans aucune des espèces mentionnées.

Le but de la note présente est de compléter l'étude des *Myc.* saprophytes avec la détermination de la sensibilité vis-à-vis des phages homologues et hétérologues et de voir dans quelle mesure la classification, basée sur les caractères morphologiques, culturels et biochimiques, s'accorde avec les groupes déterminés par les mycobactériopahges.

Nous nous sommes proposé d'étudier en même temps la lysosensibilité de 3 souches de *Myc. tbc type* (H_{37} *Rhv*, H_{37} *Rv*, *Ratti)*, 7 souches de *Myc. avium* et 37 souches de Mycobactéries *atypiques* vis-à-vis des bactériophages hétérologues, ainsi que la lysogénéite de ces souches.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les 38 souches de *Myc.* saprophytes et les 3 souches de *Myc.* tbc type proviennent de différentes collections, indigènes et internationales (tableau I); les 37 souches de *Myc.* atypiques ont été isolées entre les années 1958—1959 dans la Clinique de Phtisiologie de Bucarest, dont 12 isolées de malades traités par des tuberculostatiques, 8 de malades non-traités, le reste isolé de sujets dont nous ne possédons pas de données cliniques complètes.

Des 7 souches de *Myc. avium*, 6 souches ont été isolées à l'Institut de Pathologie et d'Hygiène animale de Bucarest (1956—1958), la septième provenant de la collection de l'Institut Cantacuzino *(Myc. avium Griffith)*.

I. La lysogénéité a été étudiée comme suit: pour les Myc. saprophytes de l'espèce *smegmatis*, *fortuitum*, *pellegrini* et *thamnopheos* on a utilisé des cultures en bouillon de 2 jours traitées comme suit: cultures inactivées 1 h à 60°, cultures tuées au chloroforme et cultures centrifugées.

Pour les Mycobactéries de l'espèce *phlei*, on a employé: des cultures en bouillon de deux jours traitées au chloroforme, des cultures centrifugées et enfin des cultures filtrées à froid.

Pour les *Myc. tbc* type on a effectué des préparations de cultures de 2 3 semaines sur milieu Sauton + Tween 80 (0,4%) inactivées 1 h à 60°.

Pour les *Myc. atypiques* et *aviaires*, on a préparé des cultures de 6 jours en bouillon glycérol 7% + chlorure de calcium 0,004 M et en milieu Sauton + Tween 80 (0,4%), inactivées une heure à 60°.

Toutes ces préparations ont été testées sur les 85 souches de Myc. étudiées.

II. La lysosensibilité des différentes mycobactéries a été testée vis-à-vis des mycobactériophages: phlei, pellegrini, minetti, rabinowitsch, froman, 3 phages anti-smegmatis (I.S. Rome 1958), lacticola et Rosset (Inst. Pasteur de Paris, 1957) et envers le phage anti-smegmatis de l'Institut Cantacuzino, Bucarest 1954 (Tableaux I et II).

Les Mycobactéries saprophytes ont été également testées vis-à-vis de 5 phages antidiphtériques, 2 actinophages et 11 phages endogènes, provenant des Myc. atypiques lysogènes : 94, 89, 90, 97, 104, 105, 106, 110, 26A, 12A et 35A.

Les phages ont été utilisés soit tels quels, soit en dilution critique, selon le degré d'activité de chacun d'eux.

Technique employée: ensemencement d'une suspension homogène de germes, sur plaques avec agar glycérol, ou sur milieu Sauton, incubés une demi-heure à 37° pour les *Myc.* saprophytes et 24—48 heures pour les *Myc.* atypiques, aviaires et pathogènes type (de collection), les phages étant ajoutés avec l'anse calibrée sur la surface ensemencée. La lecture se fait après incubation de 24—48 heures à 37° pour les *Myc.* saprophytes, de 7—14 jours les atypiques et aviaires, et de 7—21 jours pour les *Mycobactéries tbc.* type.

RÉSULTATS

I. *Lysogénéité.* Chez aucune des 38 souches de Myc. saprophytes étudiées, on n'a pu mettre en évidence la présence des phages endogènes, bien que deux souches (*M. pellegrini* 1471 et *M. smegmatis* « Rome » 1951) se soient montrées spontanément lysogènes.

A partir de la souche *M. smegmatis* 1951 « Rome » on a obtenu deux variantes: SA_7, lysogène, caractère qui s'est maintenu pendant 2 années, et la variante SA_8 non-lysogène.

Le caractère de lysogénie pour les Myc. atypiques a été mis en évidence chez 11 souches (94, 106, 90, 26A, 110, 89, 104, 12A, 97, 35A, 105) par culture en bouillon glycérol 7% + chlorure de calcium 0,004 M pendant 6 jours et inactivation à 60° pendant une heure. La souche atypique 105 était lysogène, et lysosensible pour le phage endogène 90 (tableau III). Le caractère de lysogénie chez les souches de M. *atypiques* a été constaté aussi bien chez les souches isolées des malades traités par tuberculostatiques (104, 12A, 105) que chez les non-traités (96, 106).

L'état de lysogénie des souches de *M. avium* et *M. tbc* type n'a pu être mis en évidence par aucune des méthodes employées.

II. *Lysosensibilité des souches de Mycobactéries.* Tenant compte de la phagosensibilité spécifique et non-spécifique des Myc. saprophytes, pour les phages

La lysosensibilité des mycobactéries saprophytes et pathogènes vis-à-vis des mycobactériophages.

Mycobacterium		Mycobacteriophages		Phlei	Pellegrini	Vinetti	Lacticola	Rabinowitsch	Smegmatis Vilela Medici	Smegmatis Montefiore	Smegmatis	Smegmatis rana	Smegmatis Otto Lamanna	Rosett Smegmatis 469	Rosett Smegmatis 900	Froman
Crottin		Rome	1951	CL		CL	CL	CL		CL						CL
»		Paris	1956	CL		SCL		CL								CL
Phlei crottin	5	Rome	1958	CL		CL		CL								CL
Phlei		Paris	1956	CL												
Phlei		Paris	1957	CL												
—		-														
Pellegrini		Rome	1951		CL								CL			
»		Paris	1956		CL								CL			
»		Paris	1957		CL								CL			
»		Rome	1958		CL											
»	5				CL	CL										
1471		Londres	1932													
Minetti		Rome	1958			CL										
Friburgensis		Rome	1951	—	—	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL
»		Paris	1957			SCL	CL	CL		CL			CL			CL
Rabinowitsch		Rome	1951			CL	CL	CL		CL			CL			CL
»		Paris	1956			CL	CL	CL					CL			CL
»		Paris	1957			CL	CL	CL	CL	CL		CL	CL	CL	CL	CL
»		Rome	1958			CL	CL	CL		CL						
Smegmatis		Rome	1951	—	±	—	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL
»	98	Jena	1955				CL	CL	CL	CL		CL	CL	CL	CL	CL
»	345	Jena	1955				CL	CL	CL	CL		CL	CL	CL	CL	CL
»	909	Paris	1957		1 + n	CL	CL	CL	CL	CL		CL	CL	CL	CL	CL
»	170	Paris	1956				CL	CL	CL			CL	CL		CL	CL
»		Paris	1957	—	1 + n	1 + n	CL	CL	CL	CL	OL	CL	CL	CL	CL	CL
»	S_1	Rome	1958	—	—	—	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL
»	W	Rome	1958	—	1 + n	2 + n	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL
»	SA_7	Bucarest	1958	—	—	—	CL	2 + n	—	—	—	—	—	—	—	CL
»	SA_8	Bucarest	1958	—	—	—	CL	SCL	—	—	—	—	—	—	—	CL
Moeller 26		Lausanne	1950	—	±	SCL	CL	CL	CL	CL	—	CL	CL	CL	CL	CL
Milch Moeller		Paris	1957	-	+	—	CL	CL	CL	CL	—	CL	CL	CL	CL	CL
Milch		Rome	1958	—	—	—	CL	CL	CL	CL	—	CL	CL	CL	CL	CL
Butyricum 133		Lausanne	1951	-	3 – n	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL
»	*99*	Jena	1955	—	—	CL	—	CL	—	CL	CL	—	—			
Ranae		Lausanne	1950	-	±	±	CL	OL	CL	CL	—	CL	CL	CL	CL	CL
Grassberger		Lausanne	1950	—	—	CL	—	—	CL	CL	—	CL	CL	CL		
607		Rome	1958	—	—	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL	CL
Nayaoma Ny 14		Paris	1957	—	—	—	CL	1 + n	—	—	—	—	CL	—	—	CL
Thamnopheos		Lausanne	1950	—	—	—	—	—	—	-	—	—	—	—	—	CL
Avium griffith		Londres	1930	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	CL
»	*1154*	Bucarest	1956	—	—	—	—	—	—	—	—	CL	CL	—	-	CL
»	*Ipia*	Bucarest	1957	—	—	—	-	-	—	—	—	—	—	—	—	CL
»	*Medicina*	Bucarest	1957	—	—	CL	—	—	—	—	-	—	CL	—	—	CL
»	*1486*	Bucarest	1957	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	CL
»	*Mosneni*	Bucarest	1958	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	CL
»	*Pallas*	Bucarest	1958	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Atyp. 73		Bucarest	1958	—	1 + n	CL'	CL	—	CL	—	—	—	—	—	—	CL
H37Rv		Lausanne		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	CL
H37Ra				—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	CL
Ratti		Paris	1927	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	CL

Legende: Les noms des villes indiquent la provenance des Souche Les chifres qui suivent indiquent la date de l'admission á l'Institut Cantacuzino

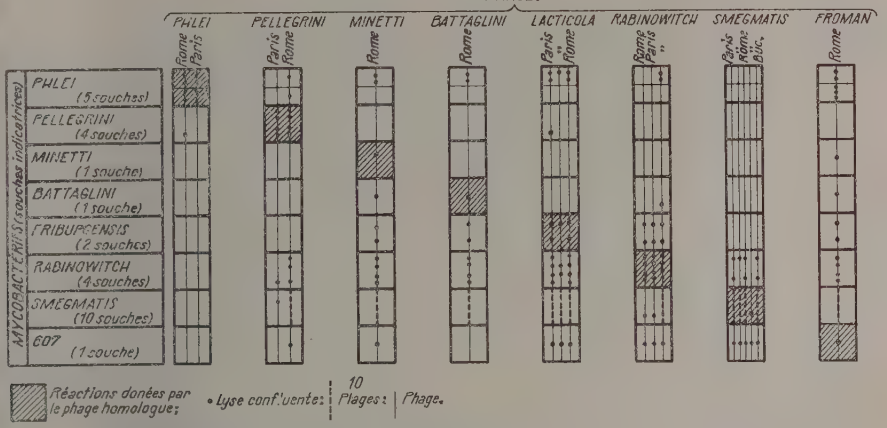
CL = lyse confluente
CL′ = CL avec colonies resistantes
OL = lyse confluente
SCL = lyse semi confluente
3 + n = 50 — 100 plages

2 + n = 50 plages
1 + n = jusqu'à 20 plages
\+ = 10 — 20 plages
± = jusqu'à 10 plages
— = ancune lyse

non-dilués et dilués, nous arrivons à la division suivante des Myc. saprophytes (tableau I et II).

a) Groupe de Mycobactéries sensibles seulement au phage homologue — tel le cas de *M. minetti.*

b) Un groupe de Mycobactéries sensibles, surtout à ses propres phages, comprenant les espèces *M. phlei* et *M. pellegrini* (l'hétérosensibilité n'étant plus évidente en dilution critique dans le groupe *M. pellegrini*).



Rapport corrélatif entre l'activité lytique des phages homologues et hétérologues chez les mycobactéries.

Fig. 1

c) Groupe de Mycobactéries dont le degré de sensibilité ne varie pas essentiellement avec la dilution du phage. Ce groupe, sensible au phage homologue et à plusieurs phages hétérologues apparents, comprend, en dehors des souches *M. smegmatis* proprement dites, les Mycobactéries: *moelleri* 37, *milch*, *butyricum*, *grassbergeri*, *ranae* et 607.

Une place à part revient aux souches *M. friburgensis* et *M. rabinowitch*, lesquelles testées vis-à-vis du groupe de phages non-dilués, se comportent comme des *M. smegmatis*, alors que testées vis-à-vis des mêmes phages en dilution critique ne sont plus lysées par les phages anti-smegmatis, ne demeurant sensibles qu'aux phages homologues et aux phages minetti et froman.

d) Il existe un groupe de Mycobactéries qui ne s'encadre dans aucun des groupes sus-mentionnés, ex.: *M. thamnopheos*, sensible seulement aux phages (non-dilués) *froman*, et puis *M. nayaoma*, qui est sensible aux phages: lacticola, rabinowitch, smegmatis (Institut Cantacuzino) et froman, et en dilution critique seulement aux phages rabinowitch et froman.

Il faut signaler le comportement particulier de la souche *M. butyricum 99*, initialement aussi lysosensible que la souche *M. butyricum* 133, mais qui testée à nouveau vis-à-vis du même set de phages non-dilués, après 6 mois, reste sensible seulement pour un nombre restreint de mycobacteriophages.

Tableau II

La lysosensibilité des mycobactéries saprophytes vis-à-vis des mycobactériophages en dilutions critiques

Mycobactéries soprophytes \ Dilutions des Mycobactériophages				10^{-1} Pellegrini	10^{-1} Minetti	10^{-3} Lacticola	10^{-1} Rabinowitsch	10^{-2} Smegmatis/ Milch-Moeller	10^{-1} Smegmatis S_1	10^{-4} Smegmatis Inst. Cantacuzino	10^{-4} Rosset/ Smegmatis 169	10^{-4} Froman
Pellegrini		Rome	1951	CL	—	—	—	—	—	—	—	
»		Paris	1956	CL	—	—	—	—	—	—	—	
»		Paris	1957	CL	—	—	—	—	—	—	—	
»		Rome	1958	CL	—	—	—	—	—	—	—	
Pellegrini 5 1471		Londres	1932	—			—	—	—	—	—	—
Minetti		Rome	1958	—	CL	—	—	—	—	—	—	—
Friburgensis		Rome	1951	—	CL′	CL′	CL	—	—		—	CL′
»		Paris	1957	—	CL	CL	CL	—	—	—	—	CL′
Rabinowitsch		Rome	1951		CL	CL	CL	—	—	—	—	2 + n
»		Paris	1956	—	CL	CL	CL	—	—	—	—	CL′
»		Paris	1957	—	CL′	CL′	CL	CL′	—	SCL	—	CL
»		Rome	1958	—	CL	CL	CL	—	—	—		—
Smegmatis		Rome	1951	—	—	CL	3 + n	CL′	—	CL	SCL	1 + n
»	*98*	Jena	1955	—		CL	CL′	CL	—	CL	CL′	CL′
»	*345*	Jena	1955	—		2 + n	3 + n	CL	—	CL′	CL′	—
»	*909*	Paris	1957	—	CL′	CL	CL	CL	—	CL′	CL′	CL′
»	*170*	Paris	1956	—	—	CL	CL′	CL	—	CL	CL	1 + n
»		Paris	1957	—	+	CL	CL′	CL	—	CL	CL′	—
»	S_1	Rome	1951	—	SCL	CL	CL	CL	CL	CL	CL′	CL′
»	*W*	Rome	1958	—	2 + n	CL	CL	CL	—	CL′	CL	2 + n
»	SA_7	Bucarest	1958	—	+	CL	2 + n	—		—	—	
»	SA_8	Bucarest	1958	—	—	CL′	SCL	—		—		—
Moeller 26		Lausanne	1950	—	3 + n	CL	CL	CL		CL	CL′	—
Milch-Moeller		Paris	1957	—	+	CL′	CL′	CL	CL	CL	CL′	1 + n
Milch		Rome	1958	—	—	CL	SCL	CL		CL	CL	2 + n
Butyricum 133		Lausanne	1951	—	CL′	2 + n	CL′	CL		CL′	CL′	CL′
»	*99*	Jena	1955		—	—		—	—	—		
Ranae		Lausanne	1950	—	1 + n	CL	CL′	CL	—	CL	CL	1 + n
Grassberger		Lausanne	1950	—	SCL	—	CL′	CL′		CL′	—	
607		Rome	1958	—	SCL	CL′	CL	CL′	CL	CL′	SCL	CL
Nayaoma Ny 14		Paris	1957	—			SCL	—	—		—	CL′
Thamnopheos		Lausanne	1950	—	—	—	—		—	—	—	CL

Il est également à remarquer le comportement différent des variantes SA_7 et SA_8 résistantes à tous les phages anti-smegmatis, à l'exception des phages lacticola, rabinowitch et froman non-dilués et aux phages lacticola et rabinowitch, en dilution critique.

e) La dernière categorie de Mycobactéries est formée de souches totalement résistantes au set de phages utilisés, ce groupe comprenant la souche *M. pellegrini* 1471.

Le tableau I contient en plus le spectre d'activité de chaque mycobactériophage.

De l'analyse du tableau I il ressort que le spectre de ces bactériophages est trés différent. Ainsi certains phages possèdent un large spectre lytique, tel le cas des phages minetti, lacticola, rabinowitch, 5 phages smegmatis et le phage froman, alors que d'autres (phlei, pellegrini, smegmatis S_1) sont actifs seulement pour un nombre restreint de souches.

On a également observé la stricte spécificité pour les souches homologues du phage phlei Rome. Le phage pellegrini s'est montré spécifique pour les souches de *M. pellegrini* et en même temps faiblement actif pour les souches *M. smegmatis* et la souche *M. atypique* 73.

A fin de mieux différencier les M. saprophytes et surtout les souches de *M. smegmatis*, on a eu recours pour les phages à large spectre, *aux dilutions critiques*. Les résultats obtenus (tableau II) sont les suivants:

Le phage pellegrini en dilution critique agit seulement sur les souches *pellegrini*. Les phages minetti, lacticola et rabinowitch (en dilution critique) présentent le même spectre d'activité. Les phages anti-smegmatis en échange, ne sont plus actifs envers les souches *M. friburgensis* et *M. rabinowitch*, restant actifs seulement pour les souches de *M. smegmatis*, *M. moelleri* 26, *M. milch*, *M. butyricum*, *M. grassbergeri*, *M.ranae* et *M.* 607.

Les souches de Mycobactéries saprophytes se sont montrées résistantes pour les 5 phages antidiphtériques employés, ainsi que pour les 11 phages endogènes, provenant des souches de Mycobactéries atypiques. Une seule souche de *M. smegmatis* a été lysée par l'un des deux actinophages employés.

Les Mycobactéries atypiques (37 souches), 4 souches scotochromogènes ont été lysosensibles (tableaux 1 et 3), respectivement: *Myc.* 73 a été sensible aux phages minetti, rabinowitch et froman; *Myc. 61* et *Myc. 105* ont été sensibles aux phages endogènes 90, et *Myc.100* à 11 phages endogènes (89, 90, 94, 97, 104, 105, 106, 110, 12A, 26 A et 35A). La souche *Myc. 105* lysosensible était aussi lysogène. Les souches *73*, *61* et *100* proviennent de malades non-traités par tuberculostatiques, la souche *105*, par contre, a été isolée d'un malade traité avec des antibiotiques.

Tableau III

Souches	Mycobactériophages										
	106	97	26A	35A	90	105	89	104	94	12A	110
61	—	—	—	—	CL	—	—	—	—	—	—
105	—	—	—	—	CL	—	—	—	—	—	—
100	1+n	1+n	1+n	2+n	2+n	2+n	1+n	1+n	3+n	2+n	1+n

Quant aux souches *M. avium* et *Myc. tbc type*, elles ont été toutes sensibles aux phage froman, à l'exception de la souche « *Pallas* » (tableau I). La souche « *Medicina* » a été lysée aussi par les phages anti-smegmatis (Inst. Cantacuzino) et minetti; la souche *1154* par le phage anti-smegmatis (Inst. Cantacuzino).

DISCUSSION

Les recherches publiées jusqu'à présent, se rapportant à l'étude de la lysogénie des Mycobactéries, sont relativement peu nombreuses (5, 6, 7, 8).

En ce qui nous concerne, nous ne sommes pas parvenus à obtenir (par les méthodes utilisées) des phages endogènes de *Mycobactéries* saprophytes, sauf la variante SA_7, obtenue à la suite de la dispersion sur agar de la souche de *M. smegmatis* Rome 1951, qui s'est maintenue lysogène environ 2 ans.

Contrairement à Takeya et coll. (7) qui n'ont pas rencontré de souches spontanément lysogènes de M. saprophytes, nous avons rencontré deux souches spontanément lysogènes, *M. pellegrini 1471* et la souche *M. smegmatis* Rome 1951.

Pour les Myc. atypiques, leur lysogénéité a pu être mise en évidence chez 29,7% des souches.

De nos recherches ainsi que de celles d'autres auteurs, il ressort qu'à l'aide de phages à spectre varié, les souches de Myc. saprophytes étudiées par nous peuvent être réparties en groupes distincts; ainsi on peut distinguer (tableau I et II): le *groupe M. phlei* qui comprend 13,2% des souches, le *groupe M. pellegrini* dans lequel s'encadrent 16% des souches et le *groupe smegmatis* qui inclut 63,1% des souches étudiées.

Dans le *groupe smegmatis*, à part les souches smegmatis proprement dites, se trouvent les souches *M.moelleri*, *milch*, *butyricum*, *ranae*, *grassbergeri*, *607*, *rabinowitchi* et *friburgensis*. Il est à remarquer que l'utilisation des phages en dilution critique a divisé le groupe *smegmatis*, homogène du point de vue biochimique, en 2 groupes différents: sous-groupe *M.smegmatis* et sous-groupe *M. friburgensis-rabinowitch*.

Les souches de *M. minetti*, *M. thamnopheos* et *M. nayaoma Ny 14* forment des entités distinctes.

Pour les souches de *Myc. atypiques*, nous avons constaté qu'elles se comportent différemment des souches de *Myc. saprophytes*, non seulement du point de vue caractères culturels, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques mais, aussi du point de vue phagosensibilité. En effet, une seule souche, *73*, a été lysée par les phages minetti, rabinowitch et froman, et 3 souches (*61*, *100*, *105*) seulement par les phages endogènes, isolés des souches de Myc. atypiques.

Il faut signaler que les souches lysosensibles *73*, *61* et *100* ont été isolées des malades non-traités, par contre, la souche *105* provient d'un malade traité avec des tuberculostatiques.

Quant aux souches *M. avium*, pathogènes, nous avons constaté qu'elle étaient sensibles au phage Froman dans une proportion de 6 sur 7; indépendamment de l'aspect morphologique des colonies (3 souches de forme « S », une « SR » et 2 « R »), contrairement à Takeya et coll, qui ont trouvé que les souches typiques de *M. avium* (virulentes, de forme « S ») sont phago-résistantes et que seule les souches de Myc. avium atypiques (forme « R », non-virulentes, ou faiblement virulentes pour la volaille) sont sensibles aux phages. Deux souches

de *Myc. avium* (une « s » et l'autre « sr ») étaient sensibles aussi au phage smegmatis (Inst. Cantacuzino).

De même, 3 souches de *Myc. tbc type (H_{37} Rv, H_{37} Ra, Ratti)* se sont avérées sensibles à l'action lytique du phage Froman. Ces données confirment les recherches de Sula et coll. (8) 1959 et celle de Oeriu, Eustatziou et coll. (1954) (11), qui ont attiré l'attention sur la sensibilité des formes *R. de la M. tbc Ratti* pour le phage smegmatis.

Une mention à part doit être faite pour le parallélisme qui existe entre la division des Mycobactéries saprophytes basée sur les tests biochimiques, morphologiques et culturels et leur division en groupes d'après leur sensibilité aux mycobactériophages.

CONCLUSIONS

1. Trente-huit souches de *Myc. saprophytes* ont pu être réparties selon leur sensibilité aux mycobactériophages à spectre différent, dans les groupes suivants: *phlei* (13,2%), *pellegrini* (16%) et *smegmatis* (63,1%). Trois souches (7,7%) forment des entités distinctes.

2. L'emploi du bactériophage en dilution critique a divisé le groupe *smegmatis* (homogène du point du vue biochimique) en deux sous-groupes: *smegmatis* et *friburgensis-rabinowitch.*

3. Le faible pourcentage (10,8%), c'est-à-dire 4 des 37 souches de *Mycobactéries atypiques*, sensibles aux phages homologues et hétérologues, représente, du moins, pour le moment, une méthode impropre à la classification des Mycobactéries atypiques.

4. Les *Mycobactéries aviaire* et *tbc* type, ont été lysées dans une proportion de 90% par le phage froman, indifféremment de l'aspect morphologique des colonies.

5. La lysogénéité des *Myc. saprophytes*, *aviaires* et *tbc.* type, n'a pu être mise en évidence par les méthodes employées. Les Mycobactéries atypiques ont été lysogènes dans une proportion de 39,7%.

6. Afin d'individualiser et grouper les *Mycobactéries atypiques*, *tuberculeuses* type et *aviaire* à l'aide des phages, des recherches complémentaires sont nécessaires.

7. Soulignons enfin le parallélisme qui existe entre le groupe de Mycobactéries saprophytes établi à l'aide des tests biochimiques, morphologiques et culturels et leur répartition d'après leur réactions aux mycobactériophages non-dilués.

BIBLIOGRAPHIE

1. Eustatziou S., Meitert E., Tulpan G., Voinea M., et Eustatziou G. Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1960, **19,** IV.
2. Gordon R. et Smith M. — J. Bact., 1953, **66,** 41.
3. Gordon R. et Smith M. — J. Bact, 1955, **69,** 502.
4. Gordon R. et Mihm J.M. — J. Gen. Microbiol., 1959, **21,** 736.
5. Bowman B.U. et Redmond W.B. — Bact. Proc., 1958, **43,** 39.
6. Russel R.L. et Jann G.J. — Bact. Proc., 1958, **42,** 39.
7. Takeya K., Joshimura T., Jammamura K. et Toda T. — Ann. Rev. of Resp. Dis., 1959, **80,** 543.

8. Sula L. et Sulova J. — Rozhledy V. Tuberkulose, 1959, 19/7, 505.
9. Penso G. — Bull. O.M.S., 1949, II, 332.
10. Hauduroy P., Chain E., Florey B., Jensen K., Penso G. J. et Tréfouël J. — Bacilles tuberculeux et para-tuberculeux, 1950, Paris, Masson.
11. Oeriu S., Eustatziou G., Leventer R. et collab. — Travaux Ses. St. Méd. Acad. R.P.R., 1954, 22—24 Janv., pg. 519.

ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМ ФАГ-БАКТЕРИЯ У САПРОФИТНЫХ И ПАТОГЕННЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. 38 штаммов сапрофитных бактерий, согласно их чувствительности к микобактериофагам различного спектра, были разделены на следующие группы: *Phlei* (13,2%), *Pellegrini* (16%) и *Smegmatis* (63,1%). Три штамма (7%) составляли отдельные группы.

2. При использовании бактериофага в критических разведениях группа *Smegmatis* (гомогенная с биохимической точки зрения) была разделена на 2 группы: *Smegmatis* и *Friburgensis rabinovitchi*

3. Небольшой процент (10,8%), т.е. 4 из 37 штаммов атипичных микобактерий, чувствительных в отношении гомологичных и гетерологичных фагов, не может быть основанием считать этот метод подходящим по крайней мере в настоящий момент — для классификации атипических микобактерий.

4. Птичьи микобактерии, а также микобактерии туберкулезного типа, при использовании фага Фромана, подверглись лизису в 90% случаев, в независимости от морфологической картины колоний.

5. Лизогенность сапрофитных микобактерий птичьего типа, а также и туберкулезного типа, не могла быть установлена при помощи использованных методов. Атипические бактерии оказались лизогенными в пропорции 39,7%.

6. Для индивидуализации также и группы атипичных и туберкулезных микобактерий или же микобактерий птичьего типа при помощи фагов, необходимы добавочные исследования.

7. В конце статьи авторы подчеркивают параллелизм, который существует между группой сапрофитных микобактерий, установленных при помощи биохимических, морфологических и культуральных тестов и между их распределением, согласно реакциям в отношении неразведенных микобактериофагов.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER PHAGEN-BAKTERIEN-SYSTEME BEI SAPROPHYTISCHEN UND PATHOGENEN MYKOBAKTERIEN

ZUSAMMENFASSUNG

1. Auf Grund ihrer Empfindlichkeit für Mykobakteriophagen mit verschiedenen Wirkungsspektren, konnten 38 saprophytische *Mykobakterienstämme* in folgende Gruppen eingeteilt werden: *Phlei* (13,2%), *Pellegrini* (16%) und *Smegmatis* (63,1%). Drei Stämme bilden selbständige Einheiten.

2. Durch Verwendung der Bakteriophagen in kritischer Verdünnung, konnte die *Smegmatis* — Gruppe (die vom biochemischen Standpunkt homogen ist) in zwei Untergruppen geteilt werden: *Smegmatis* und *Friburgensis-Rabinowitchi*.

3. Da der Prozentsatz der für homologe oder heterologe Phagen empfindlichen atypischen Mykobakterien gering ist (10,8%, das heisst 4 von 37 Stämmen), scheint dieses Verfahren, wenigstens gegenwärtig, für die Klassifizierung atypischer Mykobakterien ungeeignet zu sein.

4. Unabhängig vom morphologischen Aussehen der Kolonien, wurden 90% der Mykobakterien der Typen *avium* und *tuberculosis* durch Fromanphagen gelöst.

5. Bei saprophytischen Mykobakterien oder bei solchen der Typen *avium* und *tuberculosis* konnte mit den angewendeten Methoden keine Lysogenität nachgewiesen werden. Atypische Mykobakterien waren zu 29,7% lysogen

6. Zusätzliche Untersuchungen sind notwendig, um zu einer Individualisierung und Einteilung der atypischen oder den Typen *avium* und *tuberculosis* angehörenden Mykobakterien zu gelangen.

7. Schliesslich wird der Parallelismus hervorgehoben, der zwischen der nach biochemischen, morphologischen und kulturellen Merkmalen durchgeführten Gruppierung saprophytischer Mykobakterien und deren Einteilung nach ihrer Reaktionsweise auf unverdünnte Mykobakteriophagen besteht.

INVESTIGATIONS ON PHAGE-BACTERIUM SYSTEMS IN SAPROPHYTIC OR PATHOGENIC MYCOBACTERIA

SUMMARY

1. According to their susceptibilitiy to mycobacteriophages displaying different spectra, 38 strains of saprophytic mycobacteria could be divided into the following groups: *Phlei* (13.2 per cent). *Pellegrini* (16 per cent) and *Smegmatis* (63.1 per cent) Three strains (7.7. per cent) form distinct entities.

2. By using the bacteriophage in critical dilution, the *smegmatis* group (which is homogenous from the biochemical standpoint) could be divided into two subgroups, i.e. *smegmatis* and *friburgensis-rabinowitchi*.

3. Owing to the low incidence rate of atypical mycobacteria which are susceptible to homologous or heterologous phages (10.8 per cent, i.e. 4 out of 37 strains), phage typing appears, for the present al least, to be an inadequate method for the classification of atypical mycobacteria.

4. Irrespective of the morphological aspect of the colonies, 90 per cent of the mycobacteria of the avian or tuberculosis types were lysed by the Froman phage.

5. Lysogenicity of saprophytic mycobacteria or of those belonging to the avian or tuberculosis types could not be demonstrated by the methods used. Atypical mycobacteria were lysogenic in a proportion of 29.7 per cent.

6. In order to individualize and group atypical, tuberculous, and avian mycobacteria by means of phages, additional investigations are required.

7. Finally. the authors emphasize the parallelism existing between the grouping of saprophytic mycobacteria according to biochemical, morphological, and cultural tests on the one hand, and their distribution according to their reactions to undiluted mycobacteriophages on the other.

CONTRIBUTIONS À L'ÉTUDE DES MÉTHODES D'ISOLEMENT DU *CL. PERFRINGENS*

NOTE I. UNE NOUVELLE MÉTHODE D'ENRICHISSEMENT POUR L'ISOLEMENT DU *CL. PERFRINGENS* PAR COPROCULTURE

par

A. Săsărman et Thea Horodniceanu
avec la collaboration technique de Maria Dospina

(Travail de l'Institut «Dr. I. Cantacuzino» — Service des Cultures Microbiennes)

— Manuscrit reçu le 14 juillet 1960 —

Les difficultés techniques soulevées par l'étude des anaérobies n'ont pas réussi a empêcher l'intérêt suscité par leur isolement de plus en plus fréquent de différentes affections. De ce point de vue, le *Cl. perfringens* présente la plus grande importance, ce qui a conduit de nombreux auteurs à concentrer leurs efforts sur le perfectionnement des méthodes d'isolement de ce germe, presque ubiquitaire.

L'isolement du *Cl. perfringens* d'un produit pathologique contenant un nombre réduit de microbes d'association est en général aisé, vu que son développement rapide permet d'obtenir dans un bref délai sa prépondérance numérique dans la culture. Son isolement est toutefois assez laborieux si le matériel est fortement contaminé par des saprophytes, sporulés ou non-sporulés. Vu la résistance modérée des spores du *Cl. perfringens* à la chaleur et le fait que dans l'organisme il sporule rarement, le chauffage des produits pathologiques dans le but de la destruction des germes d'association n'est pas recommandé, étant même contreindiqué en cas de la présence de saprophytes sporulés.

Les recherches sur le perfectionnement des méthodes d'isolement du *Cl. perfringens* ont été dirigées dans trois directions principales. Certains auteurs (Taylor /10/, Henry /4/) partant du fait bien connu de la rapidité particulière de multiplication du germe respectif, recommandent des passages fréquents en bouillon glucosé, ce qui détermine sa prépondérance numérique dans les cultures et par conséquent son isolement aisé.

Henry (4) a également démontré que la prépondérance numérique du *Cl. perfringens* dans les cultures n'est évidente que dans les stades précoces de développement (3—6 heures), de sorte que les passages en vue de l'enrichissement doivent être effectués à intervalle court, immédiatement après l'apparition des premières bulles de gaz (10) ou des premières manifestations de croissance (12).

D'autres auteurs (Hall /3/, Spray /9/) ont essayé d'utiliser pour l'isolement du *Cl. perfringens* l'action bactériostatique sélective de certains colorants en

solutions diluées (violet de gentiane, cristal violet, etc.) Ainsi, HALL (3), étudiant l'effet obtenu en ajoutant du violet de gentiane en concentration de 1/100.000 au bouillon glucosé qui servait à l'isolement du *Cl. perfringens*, montre qu'à la suite de cette addition trois passages étaient suffisants pour éliminer le *B. subtilis* de la culture. SPRAY (9) recommande l'addition d'une petite quantité de cristal violet à la surface du milieu semi-solide ou au liquide de la portion supérieure des tubes Hall, afin d'empêcher le développement des aérobies sporulés.

Dans ce stade de développement des méthodes d'isolement du *Cl. perfringens*, sont apparus, à bref intervalle, deux milieux sélectifs, basés sur l'utilisation de la néomycine (6) et de la streptomycine (12) qui, même en concentrations de beaucoup supérieures à celles qui inhibent la flore d'association, n'exercent pas d'action appréciable sur le *Cl. perfringens*.

L'étude parallèle de l'action de la streptomycine effectuée sur les Clostridies et sur certains bacilles aérobies sporulés, montre qu'une concentration de 1 mg/ml de l'antibiotique respectif en bouillon glucosé 1% n'affecte qu'en mesure réduite le développement des anaérobies, tandis qu'une concentration 10 fois plus petite était suffisante pour inhiber complètement le développement de la flore aérobie. Utilisant cette méthode en vue de purifier les Clostridies des germes d'association, WILLIS (12) obtient de 117 échantillons d'eau 81 cultures pures de *Cl. perfringens*.

L'application de la néomycine aux milieux sélectifs pour l'isolement du *Cl. perfringens* (6) a réduit dans une certaine mesure l'importance des milieux d'enrichissement, dont le rôle n'était plus celui de réaliser la prépondérance numérique du *Cl. perfringens*, mais d'obtenir un nombre suffisamment élevé de germes viables dans le milieu. Ceci explique le fait paradoxal que les auteurs respectifs, en contradiction avec l'opinion plus ancienne, incubent les tubes avec bouillon ensemencé avec les épreuves suspectes, pendant 48 heures, avant la dispersion sur les boîtes contenant le milieu sélectif avec néomycine. Etant donné l'action légèrement inhibante de la néomycine, utilisée en boîtes Nagler pour l'isolement du *Cl. perfringens type* A (concentration 100 mg/ml milieu) sur les autres types, on recommande pour l'isolement de ces derniers l'utilisation d'une concentration plus réduite d'antibiotique (50 mg/ml) (5).

L'addition de la néomycine au bouillon (500 γ/ml) n'a pas donné un pourcentage plus élevé d'isolement du *Cl. perfringens*, par rapport au témoin sans néomycine, dans le cas de 112 coprocultures (5) effectuées parallèlement par plusieurs méthodes (voir Tableau I). Les meilleurs résultats (79,4%) ont été obtenus en combinant l'enrichissement en bouillon sans néomycine pendant 24 heures à 37°C avec l'isolement sur boîtes Nagler contenant de la néomycine.

Au cours des tentatives d'isoler certains germes de l'intestin, nous avons observé que par incubation des tubes ensemencés avec les échantillons étudiés à la température de 47—48° (bain-marie), on obtient le développement d'une culture de *Cl. perfringens* à l'état presque pur.

Partant de cette observation et du fait connu que le *Cl. perfringens* se développe à 50°C, nous avons essayé de mettre au point une méthode d'isolement du *Cl. perfringens* de l'intestin, basée sur un enrichissement préalable à une température supérieure à celle qu'on utilise couramment.

Tableau I

Les résultats des coprocultures effectuées parallèlement par plusieurs méthodes en vue de l'isolement du Cl. perfringens (d'après Lilly H.A. (5).

Échantillons	Sans enrichissement		Enrichissement en bouillon sans néomycine		Enrichissement en bouillon avec de la néomycine	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Total échantillons	112	100	112	100	112	100
Positifs sur milieu Nagler sans néomycine	8	7,1	44	39,2	80	71,4
Positifs sur milieu Nagler avec de la néomycine	70	62,7	89	79,4	85	75,8

Le présent travail donne les résultats des recherches effectuées en vue de *(a)* la mise au point de la méthode, *(b)* l'explication de l'action sélective de la température et *(c)* la vérification de l'efficience de la méthode dans les coprocultures.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

(a) Tenant compte du fait bien connu du développement rapide du *Cl. perfringens*, nous avons fixé la durée de l'enrichissement, à la suite de quelques essais, à 5 heures. Cet intervalle s'est révélé suffisant si on considère les résultats obtenus par cette méthode, dans le cas des coprocultures effectuées au cours de ce travail, étant en même temps un procédé rapide (isolement en 24 heures du *Cl. perfringens)* et commode (l'ensemencement des milieux d'isolement peut s'effectuer au cours de la même matinée).

Pour l'enrichissement on a utilisé des tubes avec bouillon Vf, pH = 7,8, et pour l'isolement des boîtes Petri avec milieu Zeissler, à base de peptone Martin (les autres peptones n'ont pas donné des résultats satisfaisants du point de vue de la facilité de l'identification des colonies de *Cl. perfringens)*.

Les boîtes avec milieu Zeissler, ensemencées du milieu d'enrichissement, ont été incubées 18 heures à 37°C en anaérobiose (20—30 mm/Hg).

Pour la mise au point de la méthode, on a fait 20 coprocultures parallèles, utilisant l'enrichissement aux températures de 37°, 44°, 45°, 46°, 47°, 48°, et 49°C (ultrathermostat). Chaque échantillon a été ensemencé en 7 tubes avec bouillon Vf., incubés pendant 5 heures aux températures indiquées (1 tube pour chaque degré de température), opération suivie par l'isolement sur milieu Zeissler et incubation pendant 18 heures à 37°C en anaérobiose (20—30 mm/Hg).

Vu que les meilleurs résultats ont été obtenus aux températures comprises entre 46° 49°C, on a continué l'étude de l'effet de ces températures sur le développement de quelques souches fraîchement isolées et de collection de *Cl. perfringens*. Dans ce but nous avons utilisé 30 souches de *Cl. perfringens* (25 souches de type A, 1 de type B, 1 de type C, 1 de type D, 1 de type E et 1 de type F), ensemencées en bouillon Pope, pH 7,8, glucosé 1%, contenant de l'acide thioglycollique 0,6%, repartisé par 70 ml en flacons de 100 ml. L'incubation a été faite simultanément aux températures de 37°, 46°, 47°, 48° et 49°C (ultrathermostat). Pour chaque degré de température on a ensemencé

de chaque souche par trois flacons de bouillon Pope régénéré. Pour l'ensemencement on a utilisé une culture de 24 heures en bouillon Vf., la concentration finale de l'inoculum étant de $1^0/_{00}$.

Au moment où le développement est devenu visible à 37°C, on a effectué 2 déterminations de la densité des cultures, à intervalle d'une heure. La détermination a été faite à l'aide des standards d'opacité de l'échelle de Brown.

Pour l'appréciation des résultats on a utilisé la moyenne arythmétique des trois épreuves.

(b) Dans le but d'expliquer l'action sélective de la température fixée pour l'enrichissement (46–47°C), nous avons étudié l'effet de l'incubation à 46° -47°C, pendant 5 heures, parallèlement à l'incubation à 37°C sur le développement de 50 souches appartenant aux espèces les plus fréquemment rencontrées dans l'intestin, soit: *E. coli* — 10 souches, *Ps. aeruginosa* — 10 souches, *Staphylococcus aureus* — 10 souches, *Streptococcus faecalis* — 10 souches, *Proteus vulgaris* — 7 souches, *Proteus mirabilis* — 1 souche, *Morganella* — 2 souches.

Pour la culture des souches respectives on a utilisé du bouillon Martin, pH 7,4, glucosé $2^0/_{00}$, réparti par 40 ml en flacons de 100 ml. L'ensemencement a été effectué à partir d'une culture de 24 heures en bouillon Martin, la concentration finale de l'inoculum étant de $1^0/_{00}$.

De chaque souche on a ensemencé pour chaque degré de température 3 flacons contenant le milieu. Après incubation de 5 heures aux deux températures, on a déterminé la densité optique des cultures à l'aide des standards d'opacité de l'échelle de Brown.

(c) Afin de vérifier l'efficacité de la méthode proposée, on a effectué 100 coprocultures, utilisant simultanément avec la méthode respective l'enrichissement à 37°C.

La technique de travail adoptée a été la suivante: les échantillons à examiner ont été ensemencés par deux tubes contenant du bouillon Vf. régénéré, dont l'un a été incubé au bain-marie (46°—47°C) et l'autre à l'étuve (37°C).

Après un intervalle de 5 heures, on a fait des tubes respectifs des dispersions sur boîtes Petri avec milieu Zeissler, les incubant pendant 18 heures à 37°C en anaérobiose (20—30 mm/Hg).

Afin de purifier les souches, qui au premier ensemencement sur milieu Zeissler étaient contaminées par des germes aérobies, on a eu recours à un nouvel enrichissement au bain-marie (46°—47°C).

Les souches isolées ont été soumises à une étude complète, afin de vérifier le diagnostic mis à l'isolement.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ainsi que nous l'avons montré, les coprocultures effectuées par la technique d'enrichissement simultané à différentes températures (37°, 44°, 45°, 46°, 47°, 48°, 49°) ont donné les meilleurs résultats aux températures comprises entre 46°—49°C.

Etant donné la possibilité de l'existence des variations dans le comportement des différentes souches de *Cl. perfringens* envers une température si élevée, nous avons étudié ultérieurement l'effet de ces températures (inclusivement celle de 37°C) sur le développement des 30 souches de *Cl. perfringens*

Il résulte de cette étude qu'à la température de 46°—47°C, le développement de la majorité des souches de *Cl. perfringens* est normal * seulement quelques-unes étant légèrement inhibées, tandis qu'à 48°—49°C on constate une inhibition accentuée du développement de la majorité des souches étudiées.

Ces résultats nous ont déterminés à fixer la température d'incubation pour l'étape d'enrichissement, à 46°—47°C.

Afin d'expliquer l'action sélective de la température fixée (46°—47°C) dans le cas des coprocultures, on a étudié l'effet de l'incubation à 46°—47°C, pendant 5 heures, parallèlement à l'incubation à 37°C, sur le développement de certaines espèces bactériennes rencontrées plus fréquemment dans l'intestin. On a constaté que le développement de toutes ces souches était inhibé à 46°—47°C par rapport à la croissance obtenue à 37°C, observant des variations marquées dans le comportement de différentes espèces et même des souches appartenant à une même espèce. Ainsi les souches de staphylocoque, *Proteus*, piocyanique, ne se sont point développées à la température de 46°—47°C; des souches d'entérocoque se sont développées seulement 6 sur 10, et des souches de *E. coli* seulement 4 sur 10 à la température mentionnée. Il faut souligner que, même dans les cas des souches qui se sont développées à 46°—47°C la croissance était de beaucoup retardée à cette température par rapport à celle obtenue à 37°C.

Il résulte des faits exposés, que l'action sélective de la température de 46°—47°C, dans le cas des coprocultures effectuées pour l'isolement du *Cl. perfringens*, est due à l'inhibition de la flore d'association, sans que le développement rapide de *Cl. perfringens* soit affecté.

Les résultats des coprocultures effectuées dans le but d'isoler le *Cl. perfringens*, par enrichissement pendant 5 heures à 46°—47°C en bouillon Vf parallèlement à l'enrichissement à 37°C, suivis d'ensemencement sur milieu Zeissler incubé 18 heures à 37°C en anaérobiose (20—30 mm/Hg), sont consignés dans le tableau II.

Tableau II

Résultats des coprocultures effectuées par enrichissement à 46°—47° parallèlement à l'enrichissement à 37°C.

Échantillons	Enrichissement pendant 5 h à:	
	46°—47°C	37°C
Total échantillons	100	100
Nombre de cas où on a mis en évidence le *Cl. perfringens*	96	74
Nombre de cas dans lesquells on a obtenu des colonies isolées de *Cl. perfringens* sur milieu Zeissler	78	18

A remarquer que, tandis que par l'enrichissement pendant 5 heures à 46° -47°C on a obtenu 96% de résultats positifs, par l'enrichissement pendant

* Nous nous référons à la densité de la culture en comparaison à celle obtenue à 37°C et non à la toxigenèse.

5 heures à 37°C on n'a obtenu que 74% de résultats positifs. Le résultat atteint par nous est supérieur à celui relaté par LILLY (79,4%) par l'enrichissement pendant 24 heures à 37°C et l'isolement sur milieu Nagler avec de la néomycine (5).

La supériorité de la méthode est plus évidente encore si nous comparons le nombre des cas dans lesquels on a obtenu des colonies isolées de *Cl. perfringens* par les deux procédés. Ainsi, à la suite de l'enrichissement à 46° -47°C le nombre de cas avec colonies isolées de *Cl. perfringens* a été de 78, tandis que par enrichissement à 37°C ce nombre est de 18.

Dans le tableau III sont présentées les données concernant le rapport entre les colonies de *Cl. perfringens* vis-à-vis des colonies de germes d'association sur milieu Zeissler par enrichissement à 46°—47°C et 37°C, prouvant une fois de plus l'évidente supériorité du procédé proposé.

Tableau III

Rapport entre les colonies de *Cl. perfringens* vis-à-vis des colonies des germes d'association sur milieu Zeissler à la suite de l'enrichissement à 46° -47°C et 37°C.

Résultat obtenu sur milieu Zeissler	Enrichissement pendant 5 h à:	
	46°—47°C	37°
Total échantillons	100	100
Cultures quasi-pures de *Cl. perfringens*	24	1
Prédominance des colonies de *Cl. perfringens* (environ 2/3)	23	1
Nombreuses colonies de *Cl. perfringens* (environ 1/3) avec prédominance des germes d'association	20	9
Rares colonies de *Cl. perfringens* et colonies abondantes de germes d'association	29	63
Résultats négatifs	4	26

Totalisant les données expérimentales il résulte que dans 78% des cas on a obtenu des enrichissements évidemment supérieurs à la température de 46°—47°C par rapport à ceux obtenus à 37°C.

La méthode proposée présente en plus l'avantage d'un diagnostic rapide du *Cl. perfringens*, le résultat s'obtenant en moins de 24 heures. En effet, l'étude complète des souches obtenues a confirmé dans tous les cas, le diagnostic mis à l'isolement.

Les résultats obtenus permettent de conclure que la fréquence du *Cl. perfringens* dans l'intestin se rapproche de 100%. Malgré cette fréquence élevée, le rôle du *Cl. perfringens* dans la physiologie et la pathologie intestinale a été peu étudié.

CONCLUSIONS

1. On a réussi à mettre à point une méthode d'enrichissement pour l'isolement du *Cl. perfringens* de l'intestin, méthode qui consiste dans l'incubation du bouillon Vf. ensemencé avec les produits respectifs pendant 5 heures à 46° -47°C. Le stade d'enrichissement est suivi par l'isolement usuel sur le milieu Zeissler, incubé pendant 18 heures à 37°, en anaérobiose (20—30 mm/Hg).

2. La température d'enrichissement (46°—47°C) fixée par nous permet un développement normal (nous nous référons à la croissance et non à la toxigenèse) de la majorité des souches de *Cl. perfringens* ayant une action nettement inhi-

bante sur toutes les souches étudiées des espèces bactériennes aérobies plus fréquemment rencontrées dans l'intestin.

3. Appliquant à 100 coprocultures la méthode proposée, on a obtenu des résultats positifs en proportion de 96%, tandis que par l'enrichissement à 37°C on n'a pu obtenir que 74% de résultats positifs.

4. La méthode proposée présente en plus l'avantage d'un isolement rapide du *Cl. perfringens*, le résultat s'obtenant en moins de 24 heures.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore, 1957.
2. Bicenko B.D. — Lab. Delo., 1960, **1,** 4.
3. Hall I.C. — J. Inf. Dis., 1920, **27,** 576
4. Henry H. — J. Path. Bact., 1916—1917, **21,** 344
5. Lilly H.A. — J. Med. Lab. Techn., 1958, **15,** 165
6. Lowburry E.J.L. et Lilly H.A. — J. Path. Bact, 1955, **70,** 105.
7. Sinadskii N.E. — Lab. Delo, 1959, **6,** 33.
8. Sinai G.I. et Brigher O.G. — Mikrobiologhiceskie metodîissledovania pri infekţionnîh zabolevaniah, Medghiz, 1950.
9. Spray R.S. — J. Bact. 1936, **32,** 135
10. Taylor K. — J. Path. 1915—1916, **20,** 384.
11. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, Arnold Ldt, London, 1955.
12. Willis A.T. — J. Path. Bact, 1957, **74,** 113

К ВОПРОСУ О МЕТОДАХ ВЫДЕЛЕНИЯ *CL. PERFRINGENS*

СООБЩЕНИЕ I. — НОВЫЙ МЕТОД ОБОГАЩЕНИЯ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ *CL. PERFRINGENS* ТИПА А. КОПРОКУЛЬТУРОЙ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Выработан новый метод обогащения для выделения из кишечника *Cl. perfringens*. Метод состоит в инкубации бульона Vf засеянного соответствующим материалом, в течении 5 часов при 46°—47°C. За этапом обогащения следует выделение обычным способом на среде Цейсслера, инкубированном в течении 18 часов при 37°C, в условиях анаэробиоза (20—30 мм ртути).

2. Температура, выбранная для обогащения (46°—47°C) допускает нормальное развитие (что касается роста, но не токсинообразования) большинства штаммов *Cl. perfringens* резко задерживая рост всех изученных штаммов, принадлежащих к аэробным бактерийным видам, наиболее часто встречающимся в кишечнике.

3. При применении предлагаемого метода для 100 посевов испражнений, получены положительные результаты в 96%, в то время как путем обогащения при 37°C, получены положительные результаты лишь в 74%.

4. Предлагаемый метод имеет преимущество в скором выделении *Cl. perfringens* результаты получаются в течении промежутка времени короче суток.

BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER METHODEN ZUR ISOLIERUNG VON *CL. PERFRINGENS*

1. MITTEILUNG — EIN NEUES ANREICHERUNGSVERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON *CL. PERFRINGENS* TYPUS A DURCH STUHLKULTUR

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es gelang ein Anreicherungsverfahren für die Isolierung des *Cl. perfringens* aus dem Darm herzustellen, indem der mit den entsprechenden Proben beimpfte V. F. Nährbouillon während 5 Stunden bei 46—47°C bebrütet wird. Nach dem Anreicherungstadium folgt

die gewöhnliche Isolierung auf dem Zeissler Nährboden, der während 18 Stunden bei 37 in Anaerobiose (20—30 mm Hg) bebrütet wird.

2. Die von uns festgestellte Anreicherungstemperatur (46—47°C) ermöglicht eine normale Entwicklung der meisten *Cl. perfringens*-Stämme (es handelt sich hier um das Wachstum, nicht um die Toxinbildung), während gegenüber allen untersuchten aeroben, im Darm häufig vorkommenden Stämmen, eine ausgeprägte hemmende Wirkung zu beobachten war.

3. Die aus 100 Faekalenproben durchgeführten Kulturen ergaben ein positives Resultat in 96% der Fälle, während durch die Anreicherung bei 37°C ein positiver Befund in einem Prozentsatzt von nur 74% erzielt wurde.

4. Das vorgeschlagene Anreicherungsverfahren bietet ausserdem auch den Vorzug einer raschen Isolierung des *Cl. perfringens* indem man das Ergebnis in weniger als 24 Stunden erhält.

CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE METHODS FOR THE ISOLATION OF *CL. PERFRINGENS*

NOTE I. — A NEW METHOD OF ENRICHMENT FOR THE ISOLATION OF *CL. PERFRINGENS* TYPE A BY COPROCULTURE

SUMMARY

1. The authors succeeded to perfect a method of enrichment for the isolation of *Cl. perfringens* from the intestine, method which is achieved by incubating the Vf. broth inoculated with the respective specimens, at 46°—47° for 5 hours. The enrichment period is followed by the usual isolation on Zeissler medium, incubated at 37° for 18 hours in anaerobiosis (20—30 mm Hg.).

2. The enrichment temperature (46°—47°) established by the authors allows a normal development (they refer to growth and not to toxicogenesis) of most *Cl. perfringens* strains, having also a distinctly inhibiting action on all investigated strains amongst aerobic bacterial species more frequently found in the intestine.

3. Applying this recommended method on 100 coprocultures, the authors obtained positive results in 96 per cent of the cases, while by enrichment at 37°C only 74 per cent of the cases were found to be positive.

4. The recommended method has in addition the advantage of realising a rapid isolation of the *Cl. perfringens*, the outcome beeing achieved in less than 24 hours.

LES ESPÈCES DE STREPTOCOQUES NON-HÉMOLYTIQUES RENCONTRÉES DANS L'ENDOCARDITE SOUS-AIGUË ET LEUR SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

par

CORALIA BALDOVIN-AGAPI, IRINA BELOIU, ILEANA CAFFÉ et PAULA PLECEAȘ

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino» — Service des Cocci pathogènes)

— Manuscrit reçu le 22 novembre 1960 —

Bien que grâce aux antibiotiques la proportion des guérisons dans l'endocardite sous-aiguë ait atteint 70—80%, le pronostic de cette affection reste toutefois réservé. Le degré de résistance aux antibiotiques des agents étiologiques joue un rôle important, en plus du degré de généralisation de l'infection, état du cœur, etc.

Les principaux agents étiologiques de cette affection sont les streptocoques non-hémolytiques ou verdissants, c'est-à-dire les streptocoques qui ne sécrètent pas d'hémolysines solubles et ne possèdent pas d'antigènes de groupe Lancefield.

Selon les données les plus récentes de la littérature, les entérocoques ne seraient responsables que de 10 à 15% des cas d'endocardite bactérienne sous-aiguë (FINLAND, 1958 (1), TOH et BALL, 1960 (2)).

D'autres espèces microbiennes, parmi lesquelles les *Neisseria*, sont rarement rencontrées dans cette affection. Ces dernières années, on a décrit: l'association de streptocoques viridans avec des *brucella* (3), streptocoques *viridans* et *b. para-influenzae* (4), *Rickettsia burneti* (5).

Les connaissances en ce qui concerne les streptocoques viridans proprement dits, principaux agents de l'endocardite sous-aiguë, ont évolué parallèlement aux progrès réalisés dans leur classification.

Le tableau I (complété d'après FARMER /20/) indique les diverses espèces de streptocoques viridans, identifiées par différents auteurs, entre les années 1938—1960. Jusqu'à l'apparition des travaux de WHITE et NIVEN (1946 /11/) la majorité des souches de streptocoques viridans figuraient sous le nom de *Str. salivarius*. Grâce aux études de SHERMAN, NIVEN et SMILEY (1943 /10/) ayant établi que l'espèce *Str. salivarius* est caractérisée par l'élaboration de levan sur milieux à sucrose, suivies de la description de l'espèce *Str. sanguis*, par WHITE et NIVEN (1946), espèce capable d'élaborer du dextran sur le même milieu de culture, de réels progrès ont été enregistrés en ce qui concerne la classification des streptocoques viridans en général et des agents de l'endocardite, en particulier.

Tableau I

Espèces de streptocoques non-hémolytiques identifiées par divers auteurs dans l'endocardite bactérienne sous-aiguë

Auteurs	Année	Nombre souches	Str. viridans							Str. non-spécifiée ou non-identifiée	Entérocoques							Groupes Lancefield					
			Str. salivarius	Str. mitis	Str. sanguis	Str. MG	Str. equinus	Str. uberis	Str. thermophilus		Str. faecalis	Str. zymogenes	Str. liquefaciens	Str. faecium	Str. durans	Str. bovis	Str. faecalis atypiques	A	B. (Str. agalactiae)	D	F	G	H
Moran	1938	20	12	—	—	—	—	—	—	3	3	2	-	-	-	—	-	-		—	-	—	
Soloway	1942	101	82	—	-	-	-	—	—	18	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—
Mac Neal, Blevins	1945	36*	13	—	—	—	7	—	—	2	6	—	—	—	—	3	—		—	—	-	-	-
Wheeler, Foley	1945	21	—	—	—	—	—	—	—	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	16	—	—	—
Niven, White	1946	113	—	45	42	—	—	—	—	4	5	—	—	—	—	12	—	—	4	—	—	1	-
Loewe et coll.	1946	106	—	39	41	-	—	—	—	5	5	—	—	-	-	11	—	—	4	-	—	—	1
Portfield	1950	29	—	—	—	—	—	—	—	19	—	—	—	—	—	-	—	—	—	4	—	—	6
Cates, Christie	1951	408	—	354	—	—	—	—	—	33**	2	—	-	—	—	—	—	—	—	—	.	—	—
Morin, Lafon	1957	22***	—	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	3	—	11	—	—	—
Présent travail	1960	68	—	8	6	1	—	2	2	4	15	3	—	3	2	4	9	—	—	(36)****	2	—	7

Légende: * = 5 souches appartenant à d'autres espèces microbiennes
** = 31 souches à hémolyse gamma
*** = 7 souches appartenant à d'autres espèces microbiennes
**** = souches incluses parmi les espèces d'entérocoques

Ainsi, Niven et White (1946 /12/) et Loewe, Plummer, Niven, Sherman (1946 /13/), ont montré que les streptocoques appartenant à l'espèce *Str. sanguis* représentent 50% environ des souches isolées de l'endocardite lente, cette espèce étant considérée par les derniers auteurs résistante à la pénicilline.

La résistance relativement accentuée à la pénicilline des entérocoques et de certaines espèces de streptocoques viridans impliqués dans l'étiologie de l'endocardite sous-aiguë et le fait que le succès thérapeutique dépend en grande partie du degré de sensibilité du germe aux antibiotiques, nous ont déterminés d'entreprendre le présent travail, dont les objectifs ont été:

1. Identification des espèces de streptocoques non-hémolytiques provenant de cas d'endocardite sous-aiguë;
2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques de ces germes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a étudié 68 souches de streptocoques à hémolyse gamma ou alpha, isolées de 57 cas d'endocardite bactérienne sous-aiguë, internés dans les hôpitaux de Iassy, Brașov et Bucarest, pendant les années 1955-1960.

Pour la caractérisation des espèces *Str. salivarius*, *Str. sanguis* et *Str. bovis* on a étudié, à part les propriétés biochimiques, la capacité d'élaborer des sucres polymérisés sur les milieux à sucrose. L'identification du levan ou du dextran a été complétée par des réactions sérologiques en présence de sérums anti-levan, anti-dextran et anti-pneumococcique type II.

Dans le cadre des espèces définies par les propriétés biochimiques, on a mis en évidence un certain nombre de types sérologiques à l'aide de la réaction de précipitation en présence de sérums immuns, préparés sur lapin.

La sensibilité aux antibiotiques a été établie par la méthode des dilutions en tubes (concentrations bactériostatique et bactéricide) pour les antibiotiques suivants: pénicilline, streptomycine, pénicilline et streptomycine, érythromycine, chloromycétine, auréomycine, terramycine et hostacycline.

Les tubes contenant des dilutions d'antibiotiques en bouillon glucosé, ont été ensemencés avec une goutte de la dilution 1/1000 d'une culture de 18 heures sur le même milieu. La dose bactériostatique était représentée par le dernier tube où on n'observait plus de croissance apparente et la capacité bactéricide, par la dernière dilution ne permettant plus le développement des germes dans les sous-cultures effectuées sur gélose sang.

RÉSULTATS

Appartenance aux espèces et types des souches de streptocoques non-hémolytiques isolées de cas d'endocardite bactérienne sous-aiguë. Des 68 souches étudiées, 36 soit 53% appartiennent à diverses espèces d'entérocoques (streptocoques groupe D, 30 souches (44%) représentant 5 espèces différentes de streptocoques viridans; deux souches font partie du groupe F Lancefield.

Il ressort du tableau II que les streptocoques viridans proprement dits sont représentés par les espèces et types suivants: 13 souches *Str. sanguis*, dont 7 souches possédant l'antigène du groupe H Lancefield et 6 souches sans antigène groupe H; ces dernières représentent au moins 3 types sérologiques distincts, dont deux types rencontrés uniquement dans des cas d'endocardite.

Les 8 souches de *Str. mitis* appartiennent à 3 types sérologiques, dont deux isolés d'endocardites. Une souche appartient à l'espèce *Str. MG*, deux à l'espèce *Str. uberis* et deux probablement au *Str. thermophilus*. Quatre souches n'ont pas été identifiées du point de vue espèce.

L'espèce *Str. sanguis* réunit, par conséquent, 43% des 30 souches de streptocoques viridans et 19% de la totalité des souches étudiées, streptocoques groupe D y compris.

La répartition par espèce des 36 souches de streptocoques groupe D a été la suivante:

15 *Str. faecalis*, 3 *Str. faecalis var. zymogenes*, 9 *Str. faecalis* atypiques, 3 *Str. faecium*, 2 *Str. durans* et 4 *Str. bovis*, l'espèce *Str. faecalis* avec la variété *zymogenes* réunissant 50% des souches d'entérocoques isolées de cas d'endocardite.

Tableau II

Répartition par espèces des streptocoques viridans et des entérocoques isolés de cas d'endocardite bactérienne pendant les années 1955—1960.

Streptocoques viridans	Nombre des souches	Streptocoques groupe D	Nombre des souches
Str. sanguis			
avec antigène groupe H	7	*Str. faecalis*	15
sans » » »	6	*Str. faecalis* var. *zymogenes*	3
Str. mitis	8	*Str. faecalis* atypiques	9
Str. MG	1	*Str. faecium*	3
Str. uberis	2	*Str. durans*	2
Str. thermophilus	2	*Str. bovis*	4
Espèce non-identifiée	4		
Total . . .	30		36

Sensibilité aux antibiotiques. On a étudié la sensibilité aux antibiotiques de 28 souches de streptocoques viridans et 38 souches d'entérocoques.

Le tableau III indique les concentrations bactériostatiques et bactéricides des divers antibiotiques pour les streptocoques viridans. La sensibilité à la pénicilline, streptomycine et pénicilline-streptomycine des différentes souches varie entre 0,005 U et 25 U respectivement gamma/ml. Il est à remarquer qu'un nombre important de ces souches présentent une résistance à la pénicilline de 1,56 U à 25 U/ml (23 de 28 souches étudiées).

La sensibilité des souches de streptocoques viridans vis-à-vis de la streptomycine se situe, dans la grande majorité des cas, entre 0,022 gamma et 1,56 gamma/ml.

Le synergisme pénicilline-streptomycine se manifeste par le fait que la grande majorité des souches sont sensibles à des concentrations allant jusqu'à 6,25 U gamma/ml (doses accessibles du point de vue thérapeutique).

Toutes les souches sont sensibles à l'érythromycine, en concentration de 0,005 à 1,56 gamma/ml.

Tableau III

Streptocoques viridans

Antibiotique	Action :	Concentrations : 0.005	0.011	0.022	0.045	0.09	0.19	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.50	25	50	100	Nombre souches
Pénicilline	bactériostatique	1	—	2	2	—	—	—	—	4	1	3	11	4	—	—	28
	bactéricide	1	—	—	1	3	—	—	—	1	2	3	11	6	—	—	
Streptomycine	bactériostatique	—	1	4	1	4	2	1	7	—		2		5	—	—	27
	bactéricide	—	—	1	1	1	2	1	6	8	—	1	1	5	—	—	
Pénicilline + Streptomycine	bactériostatique	2	2	5	1	4	—	1	5	3	4	2	—	—	—	—	29
	bactéricide	—	—	2	6	3	3	—	1	5	3	5	1	—	—	—	
Erytromycine	bactériostatique	2	10	2	3	4	2	3		—	—			—			26
	bactéricide	2	3	7	3	3	2	1	3	2	—		—	—			
Chloromycétine	bactériostatique			—		1		1	6	9	5	1	1	2	—	—	26
	bactéricide	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	9	12	3	—	—	
Terramycine	bactériostatique	—	—	—	1	1	1	—	7	2	3	1	5	6	—	—	27
	bactéricide	—	—	—	—	—	—	1	1	6	2	2	6	9	—	—	
Auréomycine	bactériostatique	—	—	—	2	—	1	2	4	7	9	1	—	—	—	—	26
	bactéricide	—	—	—	—	—	1	—	2	2	9	11	1	—	—	—	
Hostacycline	bactériostatique	—	1	—	3	2	—	2	1	5	6	1	4	2	—	—	27
	bactéricide	—	—	—	—	—	1	3	2	2	7	5	1	6	—	—	

Tableau IV

Streptocoques groupe D

Antibiotique	Action:	Concentrations: 0.005	0.011	0.022	0.045	0.09	0.19	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.50	25	50	100	Nombre souches
Pénicilline	bactériostatique	—	—	—	1	—	—	—	2	2	6	12	5	3	4	—	35
	bactéricide	—	—	—	—	—	1	—	—	1	1	1	7	4	12	8	
Streptomycine	bactériostatique	—		1	1	—			—	3	5	2	3	8	8	3	34
	bactéricide	—	—	—	1	—	1	—	—	1	2	3	5	2	6	13	
Pénicilline + Streptomycine	bactériostatique	—	—	—	1	1	3	—	2	7	8	7	1	3	1	—	34
	bactéricide		—	—	—	1		1	—	3	8	11	3	2	4	1	
Erytromycine	bactériostatique	—		1	3	5	2	7	4	8	3	—	—	—		—	33
	bactéricide	—	—	—	1	3	—	1	5	4	4	6	6	2	1	—	
Chloromycétine	bactériostatique	—			—	—	—		1	3	21	2	—	1	4	—	32
	bactéricide	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	1	—	21	8	
Terramycine	bactériostatique		—	—					1	8	6	5	3	2	7	—	32
	bactéricide	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	3	1	13	12	
Auréomycine	bactériostatique	—	—	—	—	—	—	3	2	12	3	6	5		1	—	32
	bactéricide	—	—	—	—	—	—	—	1	1	1	1	4	1	13	10	
Hostacycline	bactréiostatique	—	—	—		—	2	—	1	11	11		1	1	6	—	33
	bactéricide	—	—	—	—	—	—	2	—	—	1	—	2	5	13	10	

Les doses bactériostatiques et bactéricides de chloromycétine, terramycine, auréomycine et hostacycline sont généralement élevées (0,39 gamma à 25 gamma/ml).

Il ressort du tableau IV que la plupart des souches de streptocoques groupe D ne sont sensibles qu'à des concentrations très élevées de tous les antibiotiques utilisés, les concentrations bactéricides de pénicilline et streptomycine allant jusqu'à 100 U, respectivement 100 gamma ml. L'association pénicilline-streptomycine réduit sensiblement le nombre des souches résistantes aux concentrations élevées des deux antibiotiques considérés séparément. Si 24 de 35 souches d'entérocoques ne sont détruites qu'en présence de 25—50—100 U ml pénicilline et 25 souches à des concentration similaires de streptomycine, il ne reste que 7 souches résistantes à ces mêmes concentrations, en présence des deux antibiotiques.

L'érythromycine (de même que dans le cas des streptocoques viridans) se montre la plus efficiente.

Le comportement vis-à-vis des autres antibiotiques (chloromycétine, terramycine, auréomycine, hostacycline) est identique à celui des streptocoques viridans.

Sensibilité aux antibiotiques des souches isolées d'un même malade. Dans 7 cas, dont cinq avec streptocoques groupe D et deux avec streptocoques viridans, on a étudié plusieurs souches isolées d'un même malade. Dans 6 cas, les deux souches examinées ont été isolées simultanément (hémoculture et médullo-culture ou hémoculture et molaire extirpé). On n'a pas constaté de différences en ce qui concerne la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées de ces malades. Dans un seul cas, ont été examinées 4 souches de *Str. faecalis* isolées à intervalles variables au cours d'une année, toutes les souches révélant malgré la thérapie intensive aux antibiotiques, le même degré de sensibilité.

DISCUSSION

Les résultats présentés confirment les données antérieures en ce qui concerne la participation importante de l'espèce *Str. sanguis* dans l'étiologie de l'endocardite bactérienne sous-aiguë. Selon nos recherches, cette espèce de streptocoque est fréquemment rencontrée dans le rhino-pharynx des sujets sains et particulièrement dans les infections dentaires (14).

Notre observation montre une incidence très marquée des streptocoques groupe D (plus de 50% des cas) dans cette affection. Une proportion tout aussi élevée d'entérocoques dans l'endocardite bactérienne a été également signalée par Foley (1945 15) et Morin, Lafon, Graveleau et Delaveau (1957 16).

La présence des entérocoques dans l'endocardite a été notée pour la première fois par MacCallum et Hastings (17), qui ont décrit l'espèce *Str. zymogenes* en 1899. Ces germes sont fréquemment mentionnés ces dernières années, dans des cas d'endocardite sous-aiguë.

Il est difficile à préciser si la proportion élevée des entérocoques dans l'endocardite lente est réellement due à une progression de cette espèce au détriment des streptocoques viridans, ou bien si cette incidence ne reviendrait pas au fait que ces germes étant plus aisément cultivables, sont plus faciles à isoler du torrent circulatoire que les streptocoques viridans. Vu que la plupart des cas étudiés par nous concerne des malades ayant subi des traitements prolongés

aux antibiotiques, la fréquence élevée des entérocoques pourrait également s'expliquer par l'élimination des streptocoques viridans, plus sensibles aux antibiotiques et par la persistance des entérocoques qui sont plus résistants.

Indépendamment de la cause, l'incidence élevée des entérocoques dans l'endocardite sous-aiguë doit diriger notre attention sur le foyer de départ de l'infection.

L'endocardite sous-aiguë est une infection endogène où la fixation des germes sur les valvules antérieurement affectées (anomalies congénitales, cardites rhumatismales) est déterminée par un foyer préexistant.

Le foyers de départ pour les streptocoques viridans sont représentés, dans la majorité des cas, par des infections dentaires (8, 20). Okell et Elliot (1935/18/) ont trouvé que 10,90% des cas de pyorrhée alvéolaire présentaient des bactériémies avant l'extraction, ainsi que des bactériémies passagères, consécutives à l'intervention, dans 60,90% à 75% des cas. Il est très probable qu'en dehors des infections dentaires, d'autres foyers soient également susceptibles de générer l'endocardite bactérienne. Des bactériémies à streptocoques viridans, sans localisation apparente sur l'endocarde, sont de plus en plus souvent signalées. De nombreux cas de bactériémies ayant comme point de départ des foyers latents, chez des malades avec endocardite non-décelable du point de vue clinique, ou des septicémies à streptocoques viridans non localisés, ont été décrits. Mac Gregor (1956/19/) attire l'attention sur « l'endocardite sans souffle » chez des malades fébriles au delà d'une semaine, dont on a précisé le diagnostic d'endocardite à l'aide de l'hémoculture.

Les streptocoques du groupe D, agents étiologiques tout aussi importants que les streptocoques viridans de l'endocardite sous aiguë, ont été mis en évidence dans la circulation sanguine de nombreux cas de rhumatisme, artrite chronique évolutive, et autres affections (amygdalite, affections des voies digestives et urinaires).

L'importance de ces foyers dans la genèse de l'endocardite est soulignée par Toh et Ball, selon lesquels les entérocoques peuvent se fixer tout aussi bien sur les valvules endocardiques normales. L'incidence des endocardites à streptocoques groupe D, atteint le point culminant chez l'homme autour de 60 ans (coincidant avec les troubles des voies urinaires) et aux environs de 30 ans chez la femme. Des endocardites avec streptocoques groupe D ont été signalées à la suite de prostatectomies, dilatation urétrale, pyélonéphrite, application de forceps. Toh et Ball recommandent la prévention par la pénicilline et streptomycine des malades présentant des lésions du coeur (rhumatiques ou congénitales), soumis à des interventions gastrointestinales, gynécologiques, urologiques).

Les degrés de résistance des streptocoques groupe D à la pénicilline et streptomycine ne diffèrent, dans l'observation présente, de ceux mentionnés dans la littérature. Nous avons constaté, par contre une résistance élevée à la pénicilline des souches de streptocoques non-hémolytiques, considérés en général beaucoup plus sensibles que les entérocoques. Cette résistance peut être attribuée au traitement antérieur des malades à la pénicilline

Vu le degré élevé de résistance à la penicilline et streptomycine constaté, l'étude « in vitro » des concentrations bactériostatiques et bactéricides s'impose pour les souches isolées de chaque cas, afin d'assurer un traitement à doses efficientes d'antibiotiques.

RÉSUMÉ

L'identification de 68 souches de streptocoques non-hémolytiques provenant de 57 sujets atteints d'endocardite bactérienne sous-aiguë a montré que les streptocoques groupe D représentent 53% du total des souches et sont présents chez 51% des patients. Le reste de 30 souches de streptocoques viridans sans antigène de groupe, représente 5 espèces et 6 types. Certains types des espèces *Str. sanguis*, *Str. mitis* et *Str. uberis*, ont été isolés seulement dans l'endocardite bactérienne. L'espèce *Str. sauguis* représente 43% des souches de streptocoques viridans et 19% du total des souches étudiées.

L'incidence élevée des streptocoques groupe D dans l'endocardite bactérienne sous-aiguë doit retenir l'attention sur les foyers extra-dentaires comme point de départ de l'endocardite bactérienne sous-aiguë.

Les résultats présentés montrent, en même temps, une résistance marquée à la pénicilline des espèces de streptocoques non-hémolytiques, ainsi qu'une résistance très élevée des entérocoques. L'association pénicilline-streptomycine réduit sensiblement le nombre des souches résistantes pour chacun de ces antibiotiques, considérés séparément, cette combinaison représentant le moyen thérapeutique le plus efficace dans le traitement de cette affection.

Nous adressons par cette voie nos remerciements aux chefs des services des cliniques médicales de Bucarest, ainsi qu'aux docteurs Valeria Henţiu, Aurora Badenski et Elena Duca, pour nous avoir fourni la plupart des souches qui font l'objet de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

1. Finland M. — J.A.M.A., 1958, **166,** 364.
2. Toh C.C.S., et Ball K.P. — Brit. Med. J., 1960, II, 640.
3. Quinn R.W. et Brown J.W. — A.M.A. Arch. Int. Med. 1954, **94,** 679.
4. Gondie J.C. et Lowther C.P. — Brit. Med. J., 1951, II, 217.
5. Evans A.D., Powell D.E.B. et Burrell C.D. — Lancet, 1959, I, 864.
6. Linde L.M. et Heins H.L. — New England J. Med., 1960, **263**, 65.
7. Moran H. — Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 1938, **38,** 805.
8. Soloway M. — J. Exp. Med., 1942, **76,** 109.
9. McNeal W.J., et Blevins A. — J. Bact., 1945, **49,** 603.
10. Sherman J.M., Niven C.F. et Smiley K.L. — J. Bact., 1943, **45,** 249.
11. White J.C. et Niven C.F. — J. Bact., 1946, **51,** 717.
12. Niven C.F. et White J.C. — J. Bact., 1946, **51** 790.
13. Loewe L., Plummer N., Niven C.F. et Sherman J.M. — J.A.M.A., 1946, **130,** 257.
14. Baldovin-Agapi C., Beloiu I. et Caffe I. (travail non-publié)
15. Foley G.E. — J. Bact., 1947, **54,** 69.
16. Morin M., Lafon J., Graveleau J. et Delaveau P. — Congr. Franç. Méd. (31-e Sess., Paris, 1957, 195).
17. McCallum W.G. et Hastings T.W. — J. Exp. Med., 1899, **4,** 521.
18. Okell C.C. et Elliott S.D. — Lancet, 1935, II, 869.
19. McGregor C.A. — Brit. Med. J., 1956, II, 1011.
20. Farmer D. — Proc. Roy. Soc. Med., 1953, **46,** 201.

ВИДЫ НЕГЕМОЛИТИЧЕСКИХ СТРЕПТОКОККОВ, ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРИ ПОДОСТРОМ БАКТЕРИЙНОМ ЭНДОКАРДИТЕ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Вследствии идентификации 68 штаммов негемолитических стрептококков, происходящих от 57 больных подострым бактерийным эндокардитом, установлено, что энтерококки составляют 53% из общего количества штаммов и обнаруживаются

у 51% больных. Остальные 30 штаммов зеленящих стрептококков представляли 5 видов и 6 типов, принадлежащих к этим видам. Некоторые типы, принадлежащие к видам *Str. sanguis*, *Str. mitis*, и *Str. uberis* выделялись только от больных бактерийным эндокардитом. Вид *Str. sanguis* составляет 43% штаммов зеленящих стрептококков и 19% из общего количества иследуемых штаммов, занимая второе место после энтерококков.

Высокая частота энтерококков обращает внимание на значение очагов инфекции локализованных в мочеполовой и пищеварительной сфере, для возникновения подострого бактерийного эндокардита.

Представленные результаты выявляют также повышенную устойчивость к пенициллину видов зеленеющих стрептококков и очень высокую устойчивость энтерококков. Ассоциация пенициллина со стрептомицином значительно снижает количество штаммов устойчивых к каждому антибиотику в отдельности; отсюда следует, что данная ассоциация является наиболее эффективным терапевтическим средством при этом заболевании.

BEI SUBAKUTER BAKTERIELLER ENDOKARDITIS ANGETROFFENE NICHT-HÄMOLYTISCHE STREPTOKOKKENSTÄMME UND IHRE EMPFINDLICHKEIT FÜR ANTIBIOTIKA

ZUSAMMENFASSUNG

Aus der Bestimmung von 68 Stämmen nichthämolytischer Streptokokken, die von an subakuter bakterieller Endokarditis leidenden Patienten isoliert wurden, ergab sich, dass Enterokokken 53% aller Stämme darstellen und bei 51% aller Kranken vorkommen. Die übrigen 30 Stämme von viridans Streptokokken gehörten zu 5 Arten und 6 Typen im Rahmen der verschiedenen Arten. Einige Typen der Arten *Str. sanguis*, *Str. mitis* und *Str. uberis* wurden ausschliesslich von Fällen bakterieller Endokarditis isoliert. Die Art *Str. sanguis* stellt 43% der viridans Streptokokkenstämme und 19% aller untersuchten Stämme dar. Sie steht, ihrer Häufigkeit entsprechend, nach den Enterkokken an zweiter Stelle.

Das häufige Vorkommen der Enterokokken lenkt die Aufmerksamkeit auf die Bedeutung der Herde im Gebiet der Harn-und Geschlechtsorgane und des Verdauungsapparats für die Entstehung der subakuten bakteriellen Endokarditis.

Aus den angeführten Ergebnissen geht weiterhin eine erhöhte Widerstandsfähigkeit der viridans Streptokokken und eine sehr hohe Widerstandsfähigkeit der Enterokokken gegen Penizillin hervor. Die Verbindung von Penizillin mit Streptomyzin setzt die Anzahl der ursprünglich gegen jedes einzelne dieser Antibiotika widerstandsähigen Stämme bedeutend herab. Diese Verbindung stellt daher bei dieser Erkrankung das wirksamste unter den zur Verfügung stehenden therapeutischen Mitteln dar.

THE SPECIES OF NON-HAEMOLYTIC STREPTOCOCCI ENCOUNTERED IN SUBACUTE BACTERIAL ENDOCARDITIS AND THEIR SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS

SUMMARY

The indentification of 68 strains of non-haemolytic streptococci isolated from 57 patients suffering from subacute bacterial endocarditis revealed 53 per cent of these strains to be enterococci, which were present in 51 per cent of the patients. The remainder of 30 viridans strains belonged to 5 species and to 6 types within the various species. Some types belonging to the species *Str. sanguis*, *Str. mitis* and *Str. uberis* were exclusively isolated from cases of bacterial endocarditis. The species *Str. sanguis* accounts for 43 per cent of the viridans

strains and for 19 per cent of the total number of strains tested, holding the secod place after the enterococci as regards incidence rate.

The high incidence rate of enterococci calls attention to the part played by foci in the urogenital and digestive sphere in the genesis of subacute bacterial endocarditis.

The results reported also reveal the existence of a high degree of resistance to penicillin in the viridans species and a very high degree of resistance in the species of enterococci. The association of penicillin and streptomycin results in a considerable decrease of the number of resistant strains, as compared to the number of strains resisting each of these antibiotics separately. Hence, this combination appears to be the most efficient therapeutic means available in this affection.

ÉTUDE SUR LES MODIFICATIONS DES PROTÉINES PLASMATIQUES CHEZ LES CHEVAUX INFECTÉS EXPÉRIMENTALEMENT AVEC LE VIRUS A.I.C. ET LEURS RELATIONS AVEC LES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES ET IMMUNO-SÉROLOGIQUES

par

M. Iliesco, St. Berceanu, Al. Ţurcanu, Henriette Vainer, Elena Rădulesco et M. Ţaga

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Services d'Hématologie-Sérologie et d'Immunochimie)

— Manuscrit reçu le 20 novembre 1959—

Dans nos travaux précédents (4,5) on a étudié les modifications qui apparaissent dans le sang periphérique, la moelle osseuse et le foie des chevaux infectés expérimentalement avec le virus de l'anémie infectieuse des chevaux, ainsi que les réactions immuno-sérologiques propres à cette maladie.

Afin de compléter ces études, on a entrepris des recherches sur les modifications des protéines plasmatiques, qui font l'objet de la présente note.

MÉTHODE DE TRAVAIL

Les recherches concernant l'état de disprotéinémie ont été effectuées par les tests suivants:

1. Réaction Boselli
2. Réaction avec le sulphate de cadmium
3. Reaction Weltmann

En plus, on a effectué l'électrophorèse, la détermination du fibrinogène, la détermination de la v.s.h.

Pendant toute la durée des expériences les animaux ont été observés du point de vue clinique et on a contrôlé leur température.

Les expériences ont été faites sur six jeunes chevaux, séparés en deux lots les mêmes qui ont servi aux recherches antérieures (4,5) (graphiques 1—4) (Tableaux I et II).

Dans la période de « santé » (dépourvue de manifestations cliniques) les tests de floculation plasmatique ont été négatifs.

Cependant, l'étude des protéines plasmatiques et de la vitesse de sédimentation des hématies montrent certains faits particuliers.

On a constaté une augmentation et une diminution variables des diverses fractions protéiniques et surtout du fibrinogène; les bêta et gamma-globulines ont également varié en fonction du temps, chez le même cheval, ainsi que d'un cheval à l'autre; la v.s.h. présente aussi des modifications. D'ailleurs, l'agglutination spontanée des hématies est un phénomène bien connu chez le cheval normal.

Expé

Récolte	15 I. 1957			22 I. 1957			6 II. 1957			14 II. 1957		
										Inoculation virus		
Plasma %	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
A	36.58 26.70	32.28 32.73	40.28 35.73	30.34	26.06	27.06	26.51	27.53	25.80	34.90	34.2	25.60
α	3.20 5.96	3.49 6.44	8.48 5.81	5.09	5.60	14.07	1.36	0.91	1.46	5.60	3.70	3.70
α_1	19.63	17.70	16.78	29.73	20.85	24.31	21.82	14.16	16.71	23.60	21.50	17.60
α_2	16.43 16.19	14.21 14.94	8.30 12.18	24.64	15.25	10.24	20.46	13.25	15.25	18.00	17.80	13.90
β	16.95 16.19	19.27 14.43	19.78 21.05	0.41	0.19	9.78	14.87	16.20	17.30	15.90	17.70	28.40
ψ	11.42 17.61	14.69 14.94	11.48 14.67	28.30	40.34	24.00	22.22	12.70	21.11	18.00	16.10	12.90
γ	15.40 17.30	15.66 16.49	10.60 10.52	11.20	12.55	14.83	14.61	20.92	19.06	7.70	13.40	15.60

Expé

Récolte	4 IV 1957			9 IV 1957			25 IV 1957		
Plasma %	IV	V	Ponction VI	IV	V	VI	Fièvre IV	V	VI
A	32.75	39.35	33.65	32.26	34.23	35.21	30.60	16.00	26.00
α_1	0.85	2.81	8.90	6.96	3.11	1.52	3.00	1.60	4.64
α	23.65	14.03	19.00	23.84	18.25	14.55	24.00	18.00	20.98
α_2	22.80	11.22	10.10	16.88	15.14	13.03	21.00	16.40	16.25
β	10.00	11.80	12.02	19.13	19.70	18.56	15.60	13.60	7.43
ψ	24.50	25.85	24.5	18.74	22.40	23.69	14.10	20.40	15.30
γ	9.10	9.10	10.80	6.03	5.39	4.77	15.60	32.00	30.80

Tableau I

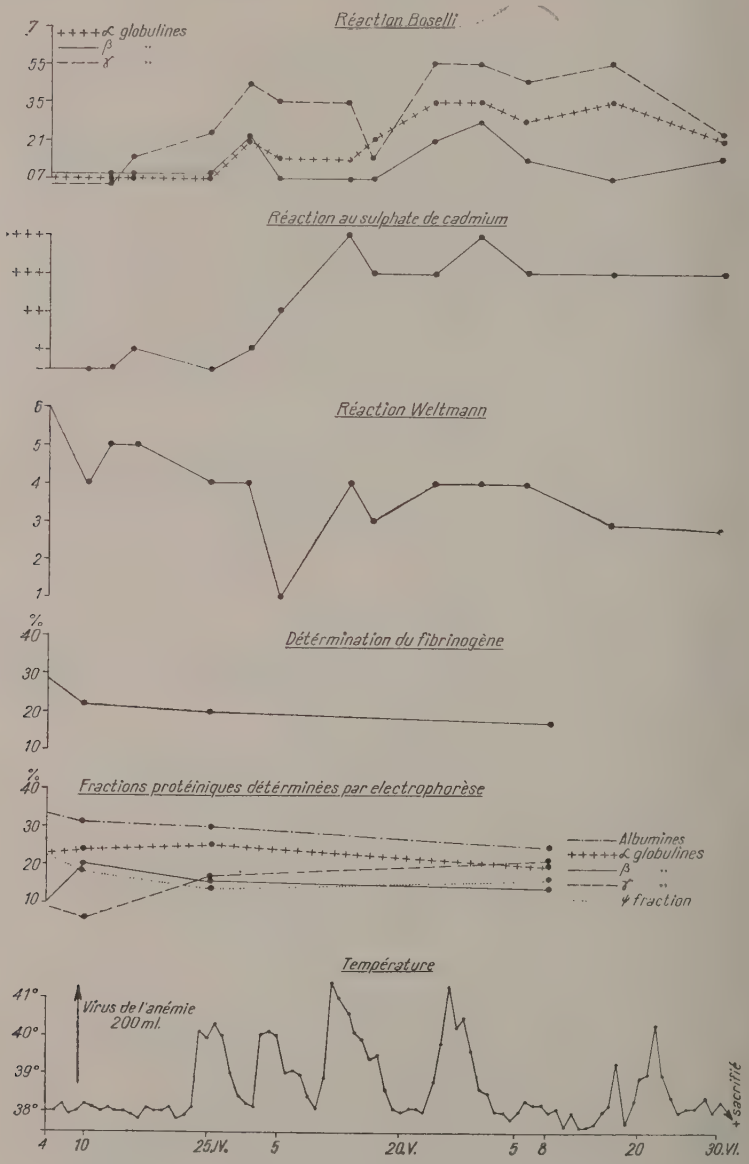
ience 1

21 II. 1957			28 II. 1957			7 III. 1957			1 IV. 1957		
						Inoculation cortizone					
I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
37.32	32.26	30.76	27.29	24.15	24.76	21.8	27.30 26.8	23.9	22.55	28.22	24.95
3.51	3.82	3.74	2.13	2.90	1.12	2.42	3.86 3.30	4.00	0.75	4.31	2.33
18.29 14.78	19.10 15.28	20.30 16.56	18.12 15.99	19.80 16.90	19.82 18.70	15.52 13.10	18.13 14.27 15.90	16.10 12.10	17.16 19.91	19.28 14.97	18.06 15.73
13.73	12.31	16.56	20.47	14.51	10.38	8.26	14.00 17.20	24.80	9.76	18.65	18.80
23.94	22.93	19.72	16.62	17.39	26.67	29.60	22.25 23.25	20.10	36.09	17.22	23.80
6.67	13.37	12.81	17.48	24.15	18.37	24.80	17.90 13.20	15.20	13.90	16.74	14.39

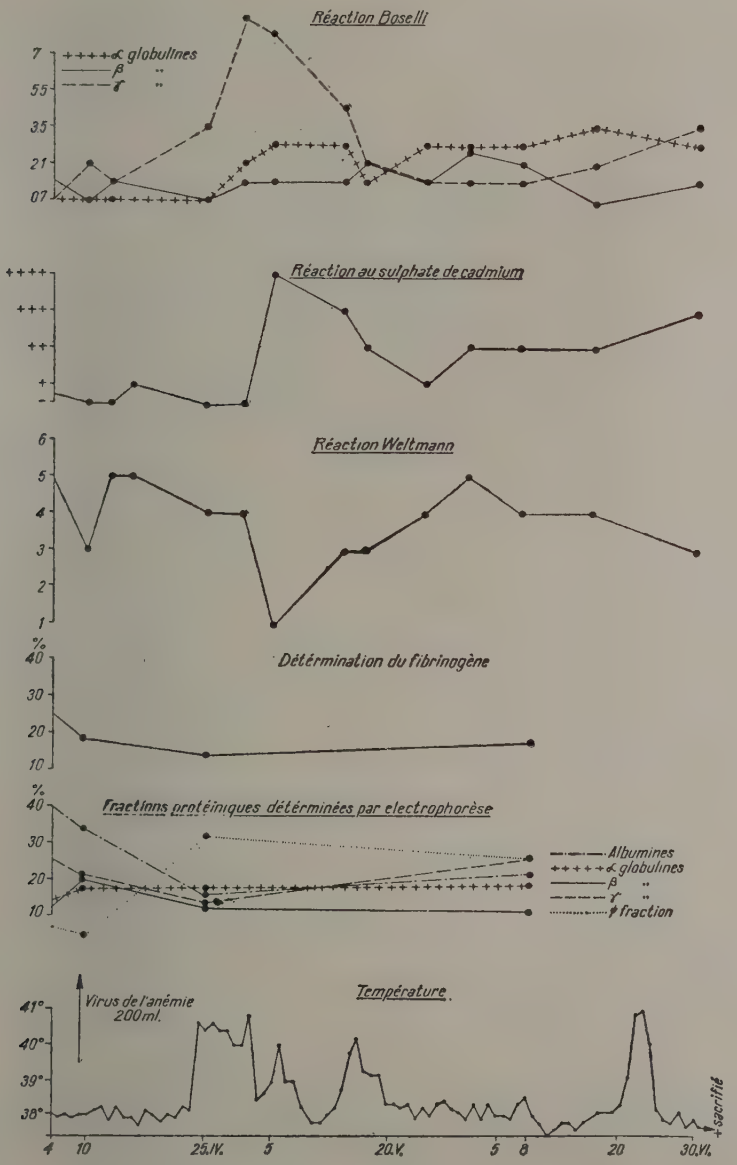
Tableau II

ience 2

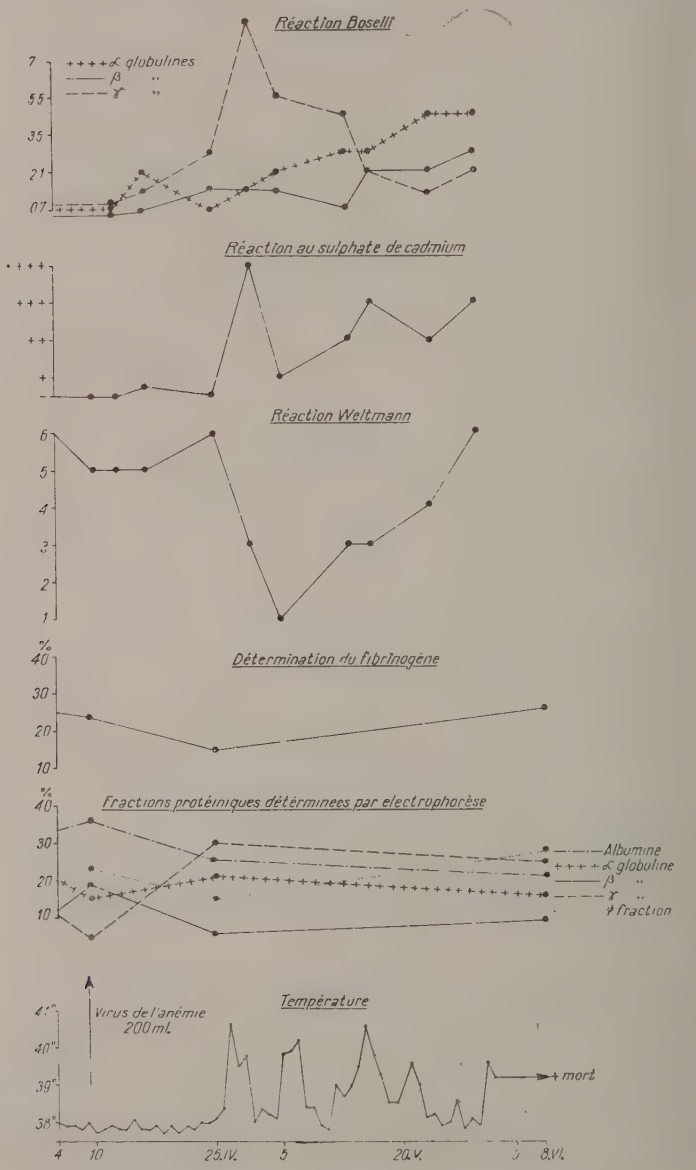
Sérum		3 VI 1957		3 VI 1957		3 VI 1957		Valeurs normales (Tisselius)
Poulain	Humain	IV		V		VI		Qualité
33.77	65.40 41.30 36.50	25.40	1.70	21.90	1.55	22.10	1.55	Blanc = 29.5 — 29.8
3.02 19.05	2.25 3.26 4.76 9.60 16.30 9.82	21.30	1.42	19.10	1.35	16.70	1.17	α = 14.7 — 20.5
31.13	9.90 19.60 16.20	13.90	0.93	15.60	1.11	8.50	0.60	β = 20.4 — 21.9
		17.70	1.18	17.00	1.20	26.40	1.85	ψ = 9.3 — 15.8
13.01	12.90 19.60 32.70	21.70	1.45	26.30	1.86	26.20	1.84	γ = 11.2 — 22.4



Graphique 1. — Poulain no. 4. Dynamique de la température et de la disprotéinémie



Graphique 2. — Poulain no. 5. Dynamique de la température et de la disprotéinémie



Graphique 3. — Poulain no. 6. Dynamique de la température et de la disprotéinémie

Il s'agit selon toute probabilité, d'une pseudo-agglutination de nature non-immunologique, due au déséquilibre des protéines plasmatiques, menant à de grandes variations de la V.S.H., qui présente une forte augmentation, surtout pendant la première demi-heure.

Dans la période d'incubation le sérum des animaux commence à présenter la positivation des tests de floculation.

En ce qui concerne les variations des protéines plasmatiques, on n'a pas réussi à mettre en évidence, par l'examen électrophorétique, des modifications constantes et caractéristiques. Les augmentations du fibrinogène avaient également été constatées avant la période d'incubation.

Il faut souligner que chez le second lot de chevaux on a observé une baisse progressive des albumines, ainsi que le commencement d'une hausse des gamma-globulines.

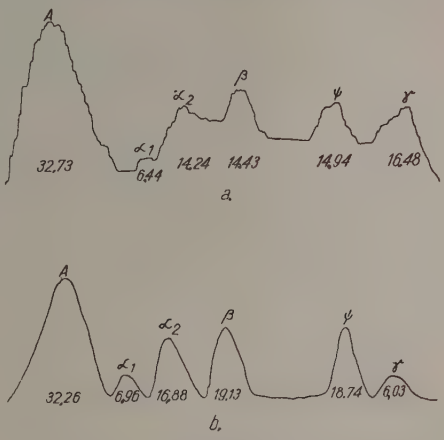
La V.S.H. n'a pas présenté de modifications significatives.

Dans la période de maladie, les modifications des protéines plasmatiques ne peuvent être considérées comme caractéristiques.

Le lot 1 a présenté une certaine tendance, plus constante, à l'augmentation du fibrinogène.

Les albumines ont présenté une certaine tendance à diminuer, sans toutefois trop baisser sous la moyenne normale.

Les gamma-globulines, diminuées dans la période de « santé » des animaux, commencent à augmenter dans la période d'incubation et restent à des valeurs modérément augmentées dans la période de maladie.



Graphique 4. — Eléctrophorèse des plasma des poulains.

a Enregistrement photométrique. Première expérience: Plasma du poulain no. 2; *b* Curbe tracée d'après les valeurs de photométrage-élution. Seconde expérience: plasma du poulain no 4.

Chez le lot 1, qui a fait une forme de maladie atténuée avec modifications morphologiques peu évidentes, les altérations des protéines plasmatiques sont également moins accentuées. On n'a presque pas observé de différence entre la période de maladie, la période d'incubation et l'état normal.

DISCUSSION

Synthétisant les résultats de toutes les investigations faites pendant la période de maladie, nous pouvons conclure que dans l'A.I.C. il existe des corrélations morpho-fonctionnelles, généralement rencontrées dans les affections du système réticulo-endothélial, mais avec certains caractères particuliers, probablement dus à l'action directe du virus sur le parenchyme hépatique et peut-être sur les hématies.

L'atteinte morphologique et sérologique concomitante, caractéristique aux maladies du système réticulo-endothélial, se manifeste en premier lieu par la grande hyperplasie de ce système dans tous les secteurs.

L'absence d'un tableau électrophorétique constant des protéines plasmatiques dans une maladie où le système réticulo-endothélial (S.R.E.) est en pleine hyperplasie et dans laquelle sont présentes d'intenses lésions dégénératives du parenchyme hépatique, peut être due en général, à un comportement particulier de réaction de la cellule vis-à-vis des processus infectieux et, en spécial, vis-à-vis des processus virotiques.

D'ailleurs, le profil des protéines plasmatiques constitue un problème à part, même chez le cheval normal. Il serait possible que les modifications électrophorétiques réduites, qui apparaissent et qui déterminent néanmoins la positivation des tests de floculation, dépendent de l'apparition d'une fraction protéinique pathologique (paraprotéine) qui migre avec n'importe quelle onde électrophorétique, sans mener à une augmentation caractéristique et constante.

L'augmentation du fibrinogène et des gamma-globulines, ainsi que la diminution des albumines — qui sont pourtant les éléments les plus constants dans l'électrophorèse —, peuvent expliquer à elles seules, la positivation des tests de floculation.

L'altération du parenchyme hépatique peut expliquer, en outre, les formes ou les périodes de maladie avec diminution du fibrinogène, ainsi que des albumines.

Il serait encore hasardé d'établir des corrélations avec les états immunologiques. Il ressort de nos recherches que les grandes perturbations du S.R.E. et des protéines plasmatiques dans l'anémie infectieuse ne mènent pas à l'apparition d'immuno-agglutinines à froid ou à chaud, caractéristiques pour d'autres maladies virotiques de système, ou pour les maladies hépatiques de la pathologie humaine. De même, on n'a pas constaté l'apparition des hétéro-agglutinines à caractères constants et spécifiques, comme on en rencontre dans certaines viroses humaines. La négativitié constante du test de Coombs, en pleine période d'anémie, prouve que les auto-anticorps bloquants n'ont pas été élaborés non plus, malgré l'affection hépatique et les perturbations du S.R.E. Selon non données, il paraît que l'anémie ne serait due à un type ou un autre d'auto-anticorps. Dans nos précédentes communications, nous avons montré que l'anémie n'était pas le phénomène initial, survenant tardivement, lorsque l'hyperplasie du S.R.E., dans le foie et la moelle a beaucoup évolué, déterminant des lésions caractéristiques. Les données histopathologiques nous ont montré cependant que cette hémolyse se produit et semble surtout être intra-vasculaire.

Il est difficile de spécifier quel est le facteur hémolytique intra-vasculaire. De nos données immunologiques il ressort qu'un mécanisme d'auto-immunisation serait exclu, le virus même restant le seul facteur important possible. Par conséquent, le problème concernant le mécanisme auto-immun n'ayant pas encore trouvé sa solution, de nouvelles recherches par d'autres méthodes s'imposent.

En ce qui nous concerne il est certain que le diagnostic de l'anémie infectieuse des chevaux peut être posé par l'examen anatomo-pathologique des lésions du foie, qui sont pathognomiques et peuvent être mises en évidence par la

méthode de la bioponction hépatique, décrite dans la première communication (4).

Les modifications morphologiques du sang périphérique, présentant une réaction réticulo-monocytaire, ainsi que les altérations — moins caractéristiques — des protéines plasmatiques (électrophorégramme et surtout les tests de floculation plasmatique), sont suffisantes pour attirer l'attention sur la possibilité de l'existence de la maladie. La ponction médullaire, qui présente une réaction quantitative et qualitative du S.R.E., peut donner des indications assez importantes, mais non spécifiques. Rappelons que les seules données sûres sont celles obtenues par la répétition des myélogrammes — qui peuvent être pratiqués sans aucune difficulté et sans aucun risque et que dans cette phase, les investigations immunosérologiques ne présentent pas d'importance pour le diagnostic.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Considérant les résultats de nos recherches expérimentales dans l'anémie infectieuse des chevaux, effectuées sur deux lots de trois jeunes chevaux, nous pouvons conclure:

1. Du point de vue morphologique d'importantes modifications hyperplasiques du S.R.E. se produisent, pouvant être mises en évidence dans le sang périphérique et surtout dans la moelle osseuse. Le foie présente également des modifications caractéristiques.

2. Les protéines plasmatiques présentent des modifications structurelles quantitatives et, probablement, aussi qualitatives, qui déterminent la positivation des tests de floculation, sans réaliser toutefois un tableau constant et caractéristique.

3. L'apparition d'imuno-anticorps (auto- iso- ou hétéro) caractéristiques et constants n'a pas été observée.

4. Du point de vue pathogénique, ces résultats constituent des arguments en faveur de l'opinion selon laquelle l'anémie infectieuse des chevaux est une maladie virotique du système réticulo-endothélial, qui atteint en même temps le parenchyme hépatique. Les premières manifestations biologiques de la maladie consistent dans l'hyperplasie générale et diffuse du S.R.E. L'hémolyse n'apparaît que plus tard et paraît ne pas être déterminée par un mécanisme auto-immun.

5. Du point de vue du diagnostic, les investigations couplées peuvent donner des indications de probabilité: la bioponction hépatique seule peut le préciser. Les résultats des investigations hématologiques périphériques, ainsi que les perturbations protéino-plasmatiques constatées ne représentent que des indices pour le diagnostic; le myélogramme offre bien plus de probabilité, mais doit être toujours confirmé par la bioponction hépatique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cerneak V.Z. — Veterinaria, 1937, No. 6, 31.
2. Feodotov A.I. — Veterinaria, 1950, No. 6, 56.
3. Guarini C., Ambrosino C. et Liberatori S. — Off. Int. Epizoot. 1956, **45**, 194.
4. Iliesco M., Berceanu St. et Couré C. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 397 et 409.

5. Iliesco M. et Turcanu Al. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1960, 19, 617.
6. Mitev G., Boutchev N. et Christov St. — Off. Int. Epizoot., 1956, 54, 271.
7. Twyble E. et Mason N. — J. Immunol., 1944, 49, 73.

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ПРОТЕИНОВ У ЛОШАДЕЙ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ И.А.Л. И СВЯЗЬ МЕЖДУ ЭТИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ И МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ И ИММУННО-СЕРОЛОГИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Обощая результаты наших экспериментальных исследований, проведенных при инфекционной анемии лошадей, на двух сериях, состоящих каждая из трех молодых лошадей, — можно придти к следующим выводам:

1. Наступают значительные морфологические изменения ретикуло-эндотелиальной системы, ведущие к гиперплазии; данные изменения выявлены при исследовании костного мозга. В печени наступают характерные изменения.

2. Белки плазмы терпят количественные, повидимому и качественные изменения структуры, ведущие к положительным реакциям флокуляции, но не образующие постоянную и характерную картину.

3. Не установлено появление характерных и постоянных иммунных антител (ауто, изо или гетеро).

4. С точки зрения патогенеза, установленные факты являются доказательствами в пользу представления, что инфекционная анемия лошадей является вирусным заболеванием ретикуло эндотелиальной системы, сопровождающимся поражением паренхима печени. Первые биологические заболевания состоят из общей и распространенной гиперплазии ретикуло-эндотелиальной системы. Гемолиз появляется позднее и — по всей вероятности — не происходит по ауто-иммунному механизму.

5. С практической точки зрения, для диагности, ассоциированные исследования способны дать показания вероятности заболевания; только биопунктат печени способен уточнить диагноз. Результат периферических гематологических исследований, также как и установленные нарушения белков плазмы является исходным моментом для диагностики. Миэлограмма дает большую вероятность положительного диагноза, который подтверждается биопунктатом печени.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE VERÄNDERUNGEN DER PLASMAPROTEINE BEI EXPERIMENTELL MIT DEM VIRUS DER IPA INFIZIERTEN PFERDEN UND IHRE BEZIEHUNGEN ZU DEN MORPHOLOGISCHEN UND IMMUNSEROLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ergebnisse der an zwei Gruppen von je drei jungen Pferden gemachten experimentellen Untersuchungen über die infektiöse Pferdeanämie (IPA) führten zu nachstehenden Schlussfolgerungen:

1. Vom morphologischen Standpunkt, kommt es zu bedeutenden hyperplastischer Veränderungen des RES, die im peripheren Blut, vor allem aber im Knochenmark nachgewiesen werden können. In der Leber treten charakteristische Veränderungen auf.

2. Die Plasmaproteine weisen quantitative, wahrscheinlich auch qualitative Veränderungen auf, die zur Positivierung der Flockungsteste führen, ohne jedoch ein kostantes und charakteristisches Bild darzustellen.

3. Die Bildung von characteristischen und konstant auftretenden Immunantikörpern (Auto-, Iso- oder Heteroagglutininen) konnte nicht festgestellt werden.

4. Vom Standpunkt der Pathogenese, weisen diese Festellungen darauf hin, dass die IPA eine Viruskrankheit des RES mit gleichzeitiger Ergreifung des Leberparenchyms ist. Die ersten biologischen Krankheitserscheinungen bestehen in einer allgemeinen und diffusen Hyperplasie des RES. Die Hämolyse tritt erst später auf und scheint nicht auf einen Autoimmunitätsmechanismus zurückzuführen zu sein.

5. Vom praktischen Standpunkt, ermöglichen kombinierte Untersuchungen eine Wahrscheinlichkeitdiagnose. Die Biopsie durch Leberpunktion kann allein die Diagnose sicherstellen. Die Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung im peripheren Blut sowie die festgestellten Plasmaeiweissveränderungen liefern die Ausgangspunkte für die Diagnose. Die Knochenmarkpunktion gestattet mit grosser Wahrscheinlichkeit die Diagnosestellung, die aber durch die Leberpunktion bestätigt werden muss.

A STUDY OF PLASMA PROTEIN CHANGES IN HORSES EXPERIMENTALLY INFECTED WITH THE VIRUS OF IAH. RELATIONSHIP WITH MORPHOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL CHANGES

SUMMARY.

Experimental investigations concerning infections anaemia of horses (IAH) have been carried out in two groups of three young horses each. The results led to the following conclusions.

1. From the morphological stand point, considerable hyperplastic changes occur in the RES. These may be detected in the peripheral blood but more particularly in the bone marrow. Characteristic changes occur in the liver.

2. The plasma proteins undergo quantitative, and probably qualitative structural changes which result in positive flocculation tests but do not form a constant and characteristic pattern.

3. Characteristic and constantly occuring immune antibodies (auto-, iso-, or heteroagglutinins) cannot be demonstrated.

4. From the pathogenetic standpoint, these findings suggest that IAH is a viral disease of the RES, with concomitant impairment of the liver parenchyma. The first biological manifestation of the disease is general and diffuse hyperplasia of the RES. Haemolysis appears at a later moment and does not seem to be due to an autoimmune mechanism.

5. From the practical standpoint, associated investigations may afford some indications concerning the probable diagnosis; needle biopsy of the liver will establish it with certainty. The starting point for the diagnosis is supplied by the results of haematological investigation in the peripheral blood as well as by the detection of plasma protein disturbances. Bone marrow counts will result in a highly probable diagnosis, which should, however, be confirmed by needle biopsy of the liver.

RECHERCHES SUR LA VALEUR DU TEST DE LA KÉRATO-CONJONCTIVITE DANS L'ISOLEMENT DES *SHIGELLA*

par

H. Dunăreanu et Gh. Brînduş

(Travail de l'Institut d'Hygiène et de Santé Publique de Bucarest)

— Manuscrit reçu le 5 octobre 1960 —

Les difficultés soulevées par l'établissement du diagnostic de la *Shigella* sont bien connues. Si pour le clinicien le problème de l'étiologie spécifique, y compris la détermination du type, est de moindre importance, pour l'épidémiologue et l'hygièniste il constitue une préocupation nécessaire et obligatoire.

Dans la littérature de spécialité on discute de plus en plus ces dernières années, le rôle éventuel des *Shigella* dans certaines affections gastro-intestinales à aspect infectieux qui ressemblent à la dysenterie, sans en reproduire entièrement le tableau et dont parfois on n'a pas la possibilité d'isoler des b. dysentériques ou d'autres germes pathogènes. Les gastro-entérites dysentériformes et spécialement celles des petits enfants sont fréquemment rencontrées, précédant les cas de fièvre typhoïde ou constituant les seuls épisodes entériques de saison. L'isolement de l'agent pathogène dans ces cas est particulièrement important, le diagnostic de la présence d'une *Shigella* étant d'un intérêt particulier pour l'hygièniste et l'épidémiologue.

Il semble, selon les données de plusieurs auteurs, que dans le milieu extérieur, dans lequel les *Shigella* présentent une viabilité assez élevée, elle subissent des influences qui se répercutent dans le sens d'une atypisation du germe. Les souches de b. dysentériques présentent, à l'isolement et aux premiers passages, des caractères atypiques qui se réfèrent plutôt aux propriétés biochimiques et antigéniques et moins à celles morphologiques et culturelles. Ces souches, qui n'agglutinent pas avec les sérums antidysentériques aux premiers passages, arrivent parfois, après un certain nombre de passages, à recouvrer leur agglutinabilité spécifique.

L'étude des différentes propriétés des b. dysentériques (en particulier celles de la pathogénité et de l'immunogénité) a été effectuée ces dernières années, selon une nouvelle technique, préconisée par plusieurs auteurs. Il s'agit de la propriété possédée par la *Shigella* de provoquer chez le cobaye une kérato-conjonctivite spécifique, qui permet le diagnostic et l'isolement des b. dysentériques.

Ainsi, Serény—1955—(7) a étudié de nombreuses souches de *Shigella*, qui ont provoqué chez le cobaye l'apparition d'une maladie à évolution typique de kérato-conjonctivite (oedème conjonctival, conjonctivite, exsudat muco-purulent, kératite et panus). Après quelques semaines d'évolution, la maladie finit

par la guérison totale. L'auteur a constamment obtenu de l'exsudat des b. dysentériques en cultures pures.

Gekker et Bielaia — 1957 — (3) ont examiné environ 300 souches de différentes entérobactériacées, constatant que toutes les souches de *Shigella* récemment isolées donnent des résultats positifs.

Manolov — 1957 — (5) a utilisé cette technique, avec de bons résultats, dans l'étude des problèmes de pathogénèse de la dysenterie, ainsi que du mécanisme de l'immunité antidysentérique. Ainsi que d'autres auteurs, Manolov souligne la stricte spécificité des *Shigella* dans la kérato-conjonctivite expérimentale du cobaye.

En 1959, Dunăreanu (2) a communiqué les résultats des recherches personnelles, montrant que la méthode de la kérato-conjonctivite présente une importance pratique multiple. En effet, cette méthode permet d'obtenir des cultures pures de b. dysentériques en conditions plus difficiles d'isolement et donne la possibilité, dans le cas de la *Sh. sonnei*, d'obtenir des formes « s » en pourcentage très élevé. De même, il a démontré que le passage sur l'œil du cobaye augmente l'agglutinabilité des souches de *Shigella*.

Bielaia — 1959 — (1) a constaté que la propriété des *Shigella* de provoquer la kérato-conjonctivite varie en rapport avec le temps écoulé depuis l'isolement de la souche et avec le type de *Shigella*.

Ivanova 1959 — (4) a utilisé, avec de bons résultats, la kérato-conjouctivite comme modèle expérimental pour la détermination de la valeur de nombreux antibiotiques.

Rédey et Csizmazia — 1950 — (6) mentionnent que l'infection conjonctivale du cobaye avec des b. dysentériques offre la possibilité d'isoler les *Shigella* dans les cas où les autres méthodes n'ont pas donné de résultats positifs. Les auteurs décrivent les expériences effectuées avec deux souches de *E. coli*, qui ont provoqué une kérato-conjonctivite chez le cobaye. Les caractéristiques de ces souches, ainsi que le problème concernant la possibilité des autres espèces, à part les *Shigella*, de provoquer l'apparition de la kérato-conjoctivite, seront discutées plus tard.

Dans le but de résoudre le problème de l'amélioration des techniques d'isolement des germes pathogènes du milieu extérieur, nous avons également appliqué la méthode de la kérato-conjonctivite expérimentale, afin d'établir ou de préciser le diagnostic des *Shigella* dans les échantillons de sol, fèces des latrines ou provenant de malades et d'enfants bien portants.

Le but de nos recherches a été d'établir la corrélation entre la fréquence et le caractère de la kérato-conjonctivite et d'autres indices de la présence des *Shigella*, de vérifier la spécificité de la méthode et la valeur du test positif en absence d'autres indications, afin d'établir l'utilité de la méthode pour la pratique de laboratoire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. *Milieux de culture.* Pour l'isolement des b. dysentériques on a utilisé les milieux suivants: Istrati-Meitert, Bactoagar Ploskirev (original) et Bactoagar Ploskirev (préparé à l'Institut d'Hygiène-Bucarest). Pour la détermination des principales propriétés biochimiques des souches de *Shigella*, on a utilisé

un milieu polytrope, préparé dans notre laboratoire, représentant une variante très simplifiée du milieu de Kligler.

2. *Sérums agglutinants*. L'agglutinabilité des souches suspectes a été contrôlée sur lame avec les sérums anti-dysentériques (antipolyflexner, antisonnei «S» et «R», antiboyd, antishiga, antischmitz, antilarge-sachs), antisalmonella poly «O», antipolycoli.

3. Nos expériences sur la kérato-conjonctivite expérimentale ont été effectuées sur cobayes d'âge et poids différents.

4. La matériel d'inoculation provenait de cultures de 18—20 heures sur gélose.

5. Les inoculations ont été faites sur la conjonctive, dans le fond du sac, par une anse des cultures mentionnées. Les animaux ont été examinés après 24—48 heures et à 3—7—14 jours.

Dans les cas positifs on a récolté, à l'aide de tampons stériles, le pus formé les trois premiers jours et qui inondait l'œil du cobaye, en l'ensemençant sur boîte contenant du Bactoagar Ploskirev et du milieu Istrati-Meitert.

6. Les échantillons récoltés de sujets sains (enfants d'âge prescolaire et scolaire) ainsi que ceux provenant de malades ou convalescents ont été transportés sans conservant. Les échantillons provenant d'anciens malades du foyer épidémique ont été ensemencés 36 heures après le prélèvement.

7. Les souches ont été récoltées dans diverses localités. Une des souches (No. 100) a été isolée des matières fécales récoltées dans les latrines d'un logement dont les locataires étaient sains; dans tous les tests le germe s'est comporté comme une *Shigella*.

D'autres souches (No. 12, 21, 29, 43) ont été isolées des fèces d'anciens malades, traités aux antibiotiques pour forme clinique de dysentérie dans un foyer épidémique explosif. Des 48 échantillons, tous négatifs à l'examen bactériologique pour *Shigella*, effectué dans le laboratoire de l'hôpital, nous avons isolé 4 souches, qui ont été utilisées pour provoquer la kérato-conjonctivite chez les cobayes. Les autres souches ont été isolées d'enfants entre 3 et 4 ans au cours d'une recherche plus approfondie, effectuée en vue de l'amélioration des techniques d'isolement des *Shigella* et des autres entérobactériacées, ainsi que pour l'étude de la présence réele de ces germes pathogènes chez les personnes saines ou apparémment saines et dans le milieu ambiant.

DISCUSION DES RÉSULTATS

Les caractères des souches de *Shigella* isolées des latrines et des porteurs (anciens malades ou porteurs sains) sont présentés dans le tableau I.

Le tableau I montre la propriété de provoquer la kérato-conjonctivite des souches isolées par comparaison aux autres propriétés morphologiques (mobilité) et biologiques des souches.

Le diagnostic des *Shigella* a été établi pour 6 souches en fonction de leurs propriétés morphologiques, mobilité, biochimiques et sérologiques; pour les autres souches il a été établi seulement en fonction des critériums de culture, mobilité, biochimiques et morphologiques, restant à être confirmé par la kérato-conjonctivite. Pour ces souches on a tenu compte de l'aspect culturel caractéristique des colonies de *Shigella* sur Bactoagar Ploskirev et sur milieu Istrati-Mei-

Tableau I

Caractères des souches de Shigella isolées des latrines et des porteurs

Souché No.	Mobilité	Propriétés biochimiques	Agglutine avec le sérum (sur lame)	Propriété de provoquer la kérato-conjonctivite
12	—	+	—	+
21	—	+	—	+
22	—	+	—	+
29	—	+	+ Flexner	+
43	—	+	—	+
50	—	+	+ Boyd	—
71	—	+	+ Sonne	+
100	—	+	+ Flexner	+
139	—	+	—	+
163	—	+	+ Flexner	—
171	—	+	+ Flexner	+
255	—	+	—	+
300	—	+	—	+
315	—	+	—	+
648	—	+	+ Flexner	+

tert. Le développement caractéristique sur ces milieux et, en particulier sur Bactoagar Ploskirev, ainsi que le comportement sur notre milieu polytrope différentiel, préparé dans notre laboratoire, nous ont permis de considérer ces souches comme étant des *Shigella*. Ainsi qu'il ressort du tableau I, le test de la kérato-conjonctivite a confirmé notre diagnostic.

Quatre souches (29, 163, 171, 648) ont agglutiné intensivement sur lame avec le sérum antiflexner polyvalent, une souche (71) avec le sérum antisonne et une souche avec le sérum antiboyd polyvalent.

A remarquer que toutes ces souches n'ont pas agglutiné avec les sérums agglutinants antisalmonella (poly o) et anticoli pathogènes (poly o).

On a considéré positif le test de la kérato-conjonctivite si, un à deux jours après avoir déposé une anse de culture dans le fond du sac conjonctival du cobaye, l'œil respectif présente des phénomènes inflamatoires, œdème, exsudat, pus. Dans la majorité des cas,le procès inflammatoire a manifesté un caractère aigu et une évolution locale dramatique: après 48 heures la masse purulente couvrait l'œil entier, la conjonctivite avait évolué en panus, permettant de supposer que l'œil malade était irrémédiablement perdu. Dans les autres cas, l'évolution apparente a été moins aiguë; après 24—48 heures de processus inflammatoire, avec exsudat en quantité plus réduite, la kératite s'est installée.

Dans tous les cas, ainsi que l'on a communiqué antérieurement, après 2 ou 3 semaines l'état de l'œil s'est rétabli.

La spécificité de la souche respective de provoquer la kérato-conjonctivite chez le cobaye a été également confirmée par l'isolement du pus de certaines cultures pures, qui se comportaient du point de vue culturel, biochimique et sérologique, de la même manière que la souche d'origine inoculée dans le sac conjonctival du cobaye.

Il ressort du tableau I que 13 des 15 souches étudiées ont provoqué chez le cobaye l'apparition du procéssus de kérato-conjonctivite à évolution typique. Il est intéressant de souligner que les quatre souches isolées des malades de dysenterie ont donné des résultats positifs. Ce fait est d'autant plus important que les malades avaient été antérieurement traités à l'hôpital avec des antibiotiques et que des quatre souches, trois avaient perdu les propriétés sérologiques du bacille dysentérique, sans perdre les propriétés morphologiques, culturelles et biochimiques initiales.

En ce qui concerne les souches 50 et 163 il est connu des travaux cités, que les souches de *Shigella*, en pourcentage réduit, provenues des porteurs, ne donnent pas de kérato-conjonctivite. Ces souches, dont la réaction négative est également en rapport avec leur faible pathogénité ne dépassent point 10—15% du total des souches récemment isolées. En effet, on peut constater des données du tableau I que 86% des souches ont provoqué la kérato-conjonctivite.

On peut remarquer, par la suite, qu'il existe une concordance entre les propriétés morphologiques, culturelles et biochimiques et la propriété des souches de provoquer l'apparition de la kérato-conjonctivite. Cette corrélation est d'autant plus importante que le comportement culturel, dans tous les cas, a été étudié sur trois milieux de culture différentiels et que les propriétés biochimiques se référaient aux indices caractéristiques.

Le problème des relations existant entre les propriétés antigéniques et les autres propriétés de la souche, inclusivement la capacité de provoquer la kérato-conjonctivite, nécessite une interprétation plus approfondie.

On peut constater que, par rapport à toutes les autres propriétés du germe, l'agglutinabilité avec les sérums agglutinants actuels ne présente pas un caractère constant. Plus de 50% des souches étudiées n'ont pas agglutiné avec les sérums antidysentériques. A souligner que des quatre souches isolées des malades une seule a agglutiné avec le sérum antidysentérique.

Il est bien connu, ainsi que nous l'avons mentionné, que l'atypisation des souches de *Shigella* se répercute plus fréquemment sur la perte de l'agglutinabilité ou sur l'acquisition d'une autre agglutinabilité, raison pour laquelle le critérium sérologique a été adopté pour compléter le diagnostic établi à l'aide des autres tests. L'absence d'agglutinabilité n'a pas été considérée comme une infirmation du diagnostic.

Dans ce sens, la réaction positive de kérato-conjonctivite doit être considérée comme un indice de valeur dans les cas où la souche a perdu temporairement ses propriétés agglutinantes spécifiques.

Un autre aspect qui doit être pris en considération est celui de la spécificité de la réaction. Les *Shigella* sont-elles les seules capables de provoquer la kérato-conjonctivite ou bien cette propriété est-elle plus répandue, au moins parmi les entérobactériacées?

Serény, Gekker, Bielaia et d'autres considèrent que du point de vue expérimental il s'agit d'une spécificité stricte. Dans leur travail, Rédey et Czisiazia montrent qu'ils ont obtenu, en deux cas, une kérato-conjonctivite en infectant l'œil du cobaye avec des souches de *E. coli* 0124. Néanmoins, les auteurs constatent plus loin: « la structure antigénique de l'*E. coli* 0124 est identique à celle de *Sh. dysenteriae 3* et ses propriétés culturelles sont similaires à celles des *Shigella*. Le test positif donné par ces souches ne suffit pas pour conclure que

d'autres bactéries pathogènes, à part les *Shigella*, seraient capables de provoquer la kérato-conjonctivite".

Dans nos expériences, nous avons essayé de provoquer l'apparition du processus de kérato-conjonctivite avec des souches qui ne possédaient pas les propriétés des *Shigella*. Dans aucun cas nous n'avons réussi à obtenir une réaction positive.

Par conséquent, selon les données actuelles, ont peut soutenir la spécificité des b. dysentériques dans la kérato-conjonctivite expérimentale des cobayes.

Des faits exposés, on peut déduire l'utilité présentée par cette métode dans la pratique sanitaire et épidémiologique.

L'impurification du milieu ambiant, du sol, de l'eau avec des b. dysentériques, le dépistement des porteurs sains dans des collectivités où depuis longtemps on n'a pas décrit d'épidémies ou de cas relativement fréquents de dysentérie, présentent un intérêt sanitaire.

La méthode de la kérato-conjonctivite offre la possibilité, dans nombreux cas, où les souches suspectes n'agglutinent pas avec le sérum antidysentérique et, par conséquent, ne sont pas retenues, d'être confirmés de cette manière. On obtient ainsi une image plus nette du potentiel épidémiologique, une estimation plus proche de la réalité sur le degré d'impurification qui aide à l'établissement du diagnostic bactériologique et des mesures qui s'imposent.

RÉSUMÉ

On a étudié la corrélation entre la fréquence et le caractère de la kérato-conjonctivite et des autres indices sur la présence des *Shigella ;* on a vérifié la spécificité de la méthode ainsi que la valeur du test positif en absence des autres indications.

Les résultats des recherches prouvent l'utilité du test de la kérato-conjonctivite du cobaye dans la pratique sanitaire et épidémiologique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bielaia I.A. — Journ. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1959 No. 12, 44
2. Dunăreanu H. — Microbiologia, 1959, **1**, 79
3. Gekker V.D., Bielaia I.A. et Melnik E.T. — Journ. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1957, No. 7, 110.
4. Ivanova L.K. — Journ. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1960, No. 3, 62
5. Manolov I. — Journ. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunibiol., 1957, No. 10, 95
6. Rédey B. et Czismazia F. — Acta Microbiol. Acad. Scient. Hung., 1960, **7**, 11
7. Serény B. — Acta Microbiol. Acad. Scient. Hung., 1955, **2**, 393

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕННОСТИ ПРОБЫ КЕРАТОКОНЪЮНКТИВИТА В ЦЕЛЯХ ВЫДЕЛЕНИЯ *SHIGELLA*

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В настоящей работе авторы исследовали соотношение между частотой и картиной кератоконъюнктивита и между другими указаниями наличия *Shigella*; была прове рена специфичность метода, а также и ценность положительного теста при отсутствии других указаний.

Результаты произведенных исследований доказывают полезность пробы кератоконъюнктивита на морских свинках при ее применении в санитарной и эпидемиологической практике.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN WERT DES KERATOKONJUNKTIVITISTESTES BEI DER ISOLIERUNG VON *SHIGELLA*

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Korrelation zwischen der Häufigkeit und Art der Keratokonjunktivitis einerseits und anderen Anzeichen der Anwesenheit von *Shigella* andererseits untersucht. Die Spezifizität des Verfahrens sowie die Bedeutung eines positiven Ausfalls des Testes, bei Abwesenheit anderer Hinweise, wurden nachgeprüft.

Die Ergebnisse der Untersuchung erweisen die Nützlichkeit des Keratokonjunktivitistestes beim Meerschweinchen für die sanitäre und epidemiologische Praxis.

INVESTIGATIONS CONCERNING THE VALUE OF THE KERATOCONJUNCTIVITIS TEST FOR ISOLATION OF *SHIGELLAE*

SUMMARY

In the present work the relationship between the incidence rate and character of keratoconjunctivitis and other indication of the presence of *Shigellae* has ben investigated. The specificity of the method was checked as well as the significance of a postive test in the absence of any other indication.

The results of the investigation demonstrate the usefulness in sanitary and epidemiological practice of the keratoconjunctivitis test in guinea-pigs.

SÉPARATION D'UN POLYMÈRE CONSTITUÉ D'ACIDE γ-AMINO-BUTYRIQUE À PARTIR DE LA *BORDETELLA PERTUSSIS*

par

CELLA BARBER et IRINA SOARE

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Biochimie Générale)

— Manuscrit reçu le 19 décembre 1960 —

Dans une note antérieure (2) nous avons rapporté sur un complexe antigénique à importante valeur immunisante, isolé de la *Bordetella pertussis* à l'aide d'une solution 2% de désoxycholate de sodium.

Les recherches, effectuées par le test de la double diffusion en gel d'agar, ont eu comme résultats:

— Entre l'antisérum — préparé soit avec les germes soit avec l'antigène — et l'antigène on obtenait 4—5 lignes de précipitation en gel.

— Par fractionnement de l'antigène à pH 3,5 à l'aide du ClH dilué, on a obtenu dans le précipité une « hémosensitine » spécifique, dont on a déterminé la valeur par hémagglutination indirecte, avec des hématies de mouton, formolées et tannées, sensibilisées par cet antigène.

— Par le test de la diffusion en gel, la fraction précipitée à pH 3,5 contenant l'« hémosensitine » donnait le nombre le plus élevé de lignes de précipitation (3 -4 lignes), tandis que le surnageant du précipité n'a donné qu'une seule ligne avec l'antisérum *B. pertussis* homologue.

Dans le présent travail, nous relatons les résultats obtenus par l'étude chromatographique sur papier filtre de cette fraction antigénique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour l'extraction de l'antigène on a utilisé des germes cultivés sur gélose-sang et séchés à l'acétone. La méthode de l'extraction et du fractionnement de l'antigène a été la suivante: on suspend 3g germes en 100 ml solution 2% désoxycholate de sodium, que l'on maintient 24 heures à 37° en agitant fréquemment; la séparation des germes n'est possible que par une centrifugation à 18.000 t/m. Après dialyse et séparation par centrifugation du matériel insoluble, l'antigène est precipité à pH 3,5 à l'aide du ClH dilué; le précipité formé, abondant, est séparé du surnageant per centrifugation, dissous à pH neutre et dialysé, ainsi que le surnageant, contre de l'eau courante et de l'eau distillée. Les deux fractions sont testées par rapport aux sérums antimicrobiens et aux sérums antiantigènes, par la téchnique de la diffusion en gel (OUCHTERLONY). L'analyse chimique des deux fractions a été executée par les techniques courantes.

Le surnageant du fractionnement de l'antigène obtenu à l'aide du désoxycholate de sodium 2%, objet de la présente note, qui représente environ le dixième

de l'antigène total, ayant en général une concentration initiale de moins d'un milligrame sur cmc, a été concentré en vue des analyses par dialyse contre une solution de 20% polyvinylpyrrolidon.

La chromatographie des aminoacides du produit a été exécutée (après hydrolyse de 24 heures avec du ClH 6N à 100°) sur papier Whatman no. 1, utilisant comme liquides d'irrigation le butanol-acide acétique-eau (40:10:50) et la collidine-lutidine-eau (1:3:2); comme révélateur on a employé de la ninhidrine 0,5% en butanol.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La substance qui, par fractionnement de l'antigène à l'aide de l'acide clorhydrique, reste dans le surnageant et donne une seule ligne de précipitation en gel avec l'antisérum homologue de *B. pertussis* (2), contient 13,8 g% azote, est biuret négative et ne contient pas de glucides.

La chromatographie des aminoacides du produit dialysé (hydrolisé 24 heures en ClH 6N à 100°) *a relevé la présence d'un seul spot* situé — à l'irrigation par butanol-acide acétique-eau (40:10:50) — entre l'alanine et la tyrosine. Parmi les aminoacides à RF voisins à celui de la tyrosine, se trouvent les acides aminobutyriques; en effet, par rapport aux témoins d'acide α-et γ-aminobutyrique, le spot obtenu par nous se superposait à cet aminoacide. Les RF des isomères α-et γ-aminobutyriques étant extrêmement proches en butanol-acide acétique-eau, l'irrigation par collidine-lutidine-eau (1:3:2) a permis l'identification du spot comme étant de l'acide γ-aminobutyrique, vu que dans ce liquide les isomères α-et γ ont des RF différents (Photos 1 b, etc.).

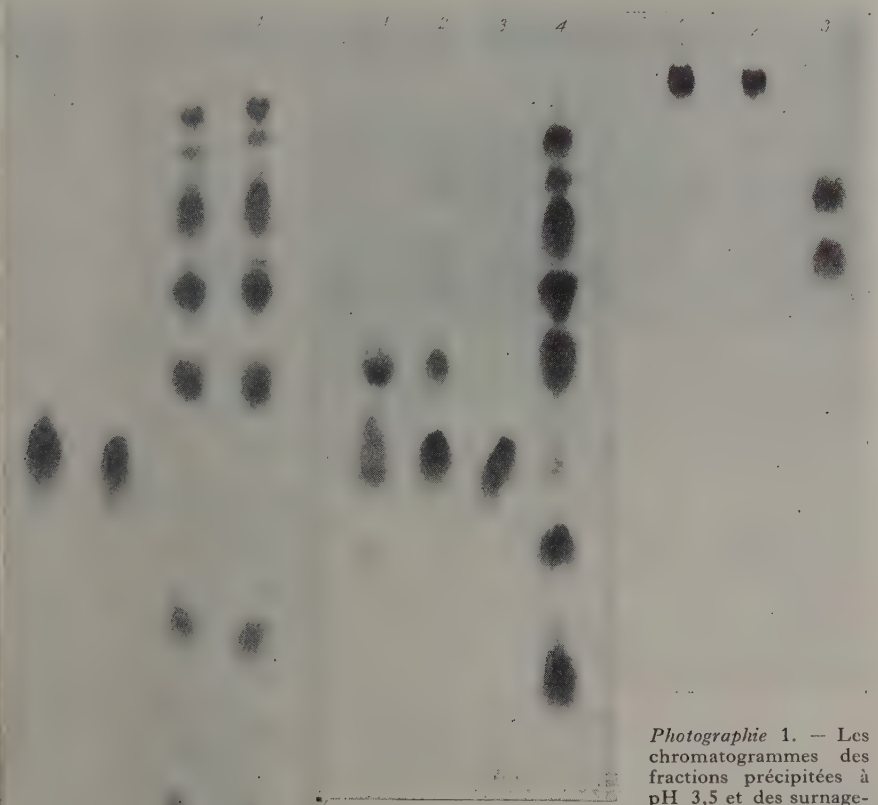
Les acides aminobutyriques sont largement distribués et ont été dernièrement trouvés en état libre dans des extraits de plantes et d'organes d'animaux (4); plus récemment on les a observé dans les hydrolysats de germes. Tandis que le staphylocoque produit de l'acide α-aminobutyrique (6), l'acide γ-aminobutyrique a été identifié dans les produits d'hydrolyse de *Pseudomonas aeruginosa* (1,5); on a également mis en évidence dans les extraits cellulaires de cette dernière, une transaminase acide γ-aminobutyrique-acide glutamique (5). Le bacille *Pumilis* (7) synthétise l'acide glutamique dont il a besoin, à partir de l'acide γ-aminobutyrique.

Un polymère, constitué seulement par des unités d'un seul aminoacide — ressemblant de ce point de vue à l'acide polyglutamique isolé de toutes les souches mucoïdes de *B. anthracis* — n'a pas été signalé jusqu'à présent. La tentative d'isoler ce polymère, constitué d'unités d'acide γ-aminobutyrique, de toutes les souches étudiées n'a pas donné des résultats; des six souches analysées il n'y a que deux qui ont permis la séparation de ce produit. Les surnageants du fractionnement à pH 3,5 des antigènes, isolés des autres quatres souches à l'aide du désoxycholate de sodium 2%, contiennent une fraction azotée dont la compostion en aminoacides ne diffère pas qualitativement de la composition en aminoacides de la fraction précipitée à pH 3.5, D'ailleurs, des deux produits obtenus de deux souches différentes, un présente sur le chromatogramme des traces d'autres aminoacides, tandis que le second n'est pas contaminé.

A cause du temps trop long écoulé entre la récolte des germes et la mise en évidence du polymère d'acide γ-aminobutyrique, on n'a pu établir aucune corré-

lation entre la présence du polymère dans deux des souches, ou son absence dans les autres, et les éventuels caractères, très différents, des deux souches dont elles proviennent.

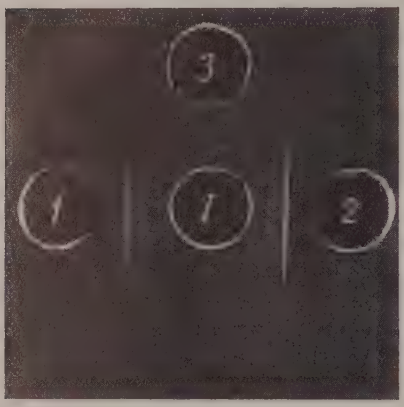
Le récent travail de LACEY (5) sur la modulation antigénique de *Bordetella pertussis* pourrait expliquer le fait que le polymère n'a pu être isolé qu'à partir de deux des six souches étudiées.



Photographie 1. — Les chromatogrammes des fractions précipitées à pH 3,5 et des surnageants de la précipitation des extraits obtenus avec la solution de désoxycholate de sodium 2%, chez deux souches différentes de *Bordetella pertussis*.

a — Irrigation en butanol-acide acétique-eau; *1* — Hydrolysat du surnageant de l'extrait de la souche 027; *2* — Hydrolysat du surnageant de l'extrait de la souche 111; *3* — Hydrolysat du précipité le l'extrait de la souche 111; *4* — Hydrolysat du précipité de l'extrait de la souche 027; *b* — Irrigation en butanol-cide acétique-eau; *1*—Témoin: alanine, acide γ-aminobutyrique, tyrosine et valine; *2*—Hydrolysat du surnageant le l'extrait de la souche 111; 3 — Hydrolysat du surnageant de l'extrait de la souche 027; 4 — Hydrolysat du précipité de l'extrait de la souche 111; *c* — Irrigation en collidine-lutidine-eau; 1 — Hydrolysat du surnageaut de l'extrait de la souche 027; *2* — Témoin: acide γ-aminobutyrique; *3* — Témoin: acide γ-aminobutyrique, valine

Selon l'avis de cet auteur, la structure antigénique de *B. pertussis* varie continuellement avec les conditions de croissance, certaines de ces conditions permettant le développement d'un de trois modes antigéniques, avec des antigènes de surface très différents; des traces de tellurite, d'acides gras ou de détergents produisent des modifications importantes dans la structures antigénique du germe. La variation d'un mode antigénique à l'autre, la modulation — selon Lacey — se produit sans mutation ou sélection; des antigènes non-détectables par agglutination peuvent apparaître transitoirement dans n'importe lequel des trois modes.



Photographie 2. I — Sérum antipertussis.

1 — Antigène extrait avec sol. 2% désoxycholate de sodium; 2 — Antigène extrait avec tampon véronal; 3 — Acide poly — γ-aminobutyrique (fraction restée dans le surnageant de la précipitation à pH 3,5)

Les problèmes suscités par le travail de Lacey, à savoir: la nécessité immédiate d'établir une corrélation entre l'état antigénique des germes et leur valeur immunisante pour les enfants; la nécessité de connaître quel est le mode antigénique optimum; si une mixture de modes serait préférable à un seul mode ou si un antigène isolé par voie chimique serait le meilleur, imposent la nécessité de continuer les recherches.

Dans l'ensemble des problèmes de la vaccination avec des extraits, nous essayerons d'établir dans nos recherches en cours, une relation entre la présence du polymère d'acide γ-aminobutyrique dans certaines souches et la valeur antigénique de ces souches.

CONCLUSIONS

Des extraits antigéniques, obtenus à l'aide d'une solution 2% de désoxycholate de sodium à partir de deux souches de *B. pertussis*, on a séparé un polymère constitué par des unités d'acide γ-aminobutyrique.

Dans la réaction de diffusion en gel on obtient, avec ce produit, une des 4—5 lignes de précipitation que donnait l'antigène total (dont il à été séparé), avec les antisérums préparés avec les germes ou avec les extraits microbiens qui contiennent ce composant.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bachrach U. — Biochem. J., 1960, **77,** 417.
2. Barber C., Soare I. et Weinbach R. — Rev. des Sciences Médicales, 1961 (sous presse)
3. Barber C. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1961, **20,** 541
4. Guilheme F. et Ferraz P. — Rev. de Path. Gén. et de Physiol. Clin., 1960, no. 719, 832.
5. Lacey B.W. — J. Hgy., 1960, **58,** 57.
6. Noe F.F. et Nickerson W.J. — J. Bact., 1958, **75,** 674.
7. Riley P.B. et Robinson H.K. — Nature, 1958, **181,** 905.
8. Tsimoda T. et Shiio J. — J. Biochem. (Tokyo), 1959, **46,** 1011.

ОТДЕЛЕНИЕ ИЗ *BORDETELLA PERTUSSIS* ПОЛИМЕРА СОСТОЯЩЕГО ИЗ ГАММА-АМИНОБУТИРОВОЙ КИСЛОТЫ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Из антигенных вытяжек полученных при помощи 2% раствора дезоксихолата натрия из 2 штаммов *Bordetella pertussis* авторы отделили полимер, состоящий из частичек гамма-аминобутировой кислоты.

При реакции диффузии в геле, этот полимер дает одну из 4—5 преципитационных зон, получающихся между общей вытяжкой, из которой был отделен полимер и между антисыворотками, приготовленными в отношении соответствующих возбудителей или микробных вытяжек, содержащих этот компонент.

DIE ABTRENNUNG EINES AUS γ-AMINOBUTTERSÄURE AUFGEBAUTEN POLYMERS AUS *BORDETELLA PERTUSSIS*

ZUSAMMENFASSUNG

Aus den vermittels einer 2 prozentigen Natriumdesoxycholatlösung aus zwei Stämmen von *Bordetella pertussis* gewonnenen Antigenextrakten, wurde ein aus γ-aminobuttersäurreinheiten aufgebautes Polymer abgetrennt.

Bei der Geldiffusionsreaktion ergibt dieses Produkt eine der 4—5 Präzipitationslinien, die auftreten, wenn der Totalextrakt aus dem es abgetrennt wurde mit Seren reagiert, zu deren Herstellung Keime oder der den betreffenden Bestandteil enthaltende Extrakt verwendet wurden.

THE SEPARATION OF A γ-AMINOBUTYRIC ACID POLYMER FROM *BORDETELLA PERTUSSIS*

SUMMARY

A polymer consisting of γ-aminobutyric acid units was separated from the antigenic extracts obtained by means of a 2 per cent sodium desoxycholate solution from 2 strains of *Bordetella pertussis*.

In gel diffusion tests, this product yields one of the 4—5 precipitation lines which are obtained in reactions between the total extract (from which the compound has been isolated) and antisera prepared by means of germs or of the bacterial extract containing this constituent.

L'AGGLUTINATION DES HÉMATIES D'HOMME FORMOLÉES ET TANNÉES PAR LES SÉRUMS HUMAINS (AGGLUTINATION HFT)

NOTE III. VALEUR DU TEST HFT POUR LE DIAGNOSTIC DE L'HÉPATITE VIROTIQUE (HV)

par

N. Moldovan, R. Weinbach, P. Steresco, O. Sferdian et E. Goldiş

(Travail de l'Hôpital No. 2 de Maladies contagieuses — Bucarest et de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino »)

— Manuscrit reçu le 9 novembre 1960 —

Le test HFT et les résultats obtenus sur des sujets apparemment sains nous ont permis d'établir la zone des valeurs normales des « unités hémagglutinantes conventionnelles » (UHC) (1). Ainsi qu'il résulte d'un titrage d'essai fait sur 8 sérums, provenant de malades d'hépatite virotique (HV), dans la période initiale de la maladie (1), les valeurs sont augmentées. Ces résultats nous ont déterminés à utiliser ce test sur une plus large échelle. C'est dans ce but que nous avons exécuté cette réaction sur 118 malades d'hépatite épidémique ou suspects de cette affection, internés à l'Hôpital No. 2 de Maladies contagieuses de Bucarest. Comme témoins nous nous sommes servis de 26 sérums de malades présentant d'autres affections.

Le diagnostic des malades étudiés a été basé sur des données épidémiologiques, cliniques et de laboratoire, en utilisant les méthodes usuelles d'investigation.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. *L'agglutination* HFT *dans l'hépatite virotique* (HV).

Du total de 118 cas internés avec un diagnostic de HV ou suspects de cette maladie, 96 cas ont été confirmés à l'hôpital.

Les résultats du test HFT chez ces 96 malades, groupés selon la forme clinique, sont consignés dans le tableau I. Ces résultats ont été répartis en 5 groupes d'après l'intensité de la réaction — de très fortement positive jusqu'à négative [voir les critériums établis dans la note I (1)].

Ainsi qu'il résulte du tableau I, les chiffres procentuels ne sont pas concluants, par contre, en rapportant les résultats obtenus aux jours de maladie (ou aux jours d'ictère) nous constatons des relations beaucoup plus éloquentes.

Pour les formes ictériques, représentant la grande majorité des cas (94%), le moment du prélèvement du sang en vue du test HFT a été établi en fonction

des jours écoulés à partir des premières manifestations ictériques, étant donné [voir note II (2)] la corrélation existant entre le résultat de la réaction et le jour de l'apparition de l'ictère; rappelons que la réaction devient négative entre le 9-e et le 12-e jour d'ictère. Dans les formes anictériques on a, bien entendu, pris en considération le jour de la maladie. Ainsi qu'il a été mentionné (2), pour ces formes la négativation de la réaction peut survenir en moyenne entre le 9-e et 19-e jour de maladie.

Tableau I

Tableau de fréquence des résultats du test HFT chez 96 malades à HV confirmée, en fonction de la forme clinique et du jour du prélèvement des épreuves de sang

Résultat de l'agglutination HFT	Forme clinique																Total	
	légère				moyenne				sévère				prolongée				anictérique					
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	E	F	G	H		
Très fortement positif					3																	
	0				3			4	0				0				0				3	3
					100																100	
Fortement positif					14	1							1				1	1				
	0				15			21	0				1			14	2			34	18	19
					83								6				11				100	
Positif	1	1		1	12	2	2	1		1			2			1		1				
	3			43	17			23	1			20	3			43	1			16	25	26
	12				68				4				12				4				100	
Faiblement positif	1				5	1	4							1								
	1			14	10			14	0				1			14	0				12	12
	8				84								8								100	
Négatif	2			1	4	4	18				4					2		3				
	3			43	26			38	4			80	2			29	3			50	38	40
	8				69				10				5				8				100	
Total	7			100	71			100	5			100	7			100	6			100	96	100
	7				75				5				7				6				100	

Légende: les chiffres en caractères courants = nombre de sérums examinés;
les chiffres en caractères gras = les pourcentages
A = sérums prélevés avant le 9-e jour d'ictère
B = sérums prélevés entre le 9-e et le 12-e jour d'ictère
C = sérums prélevés après le 12-e jour d'ictère
D = sérums prélevés dans une période non-précisée d'ictère
E = sérums prélevés avant le 9-e jour de maladie
F = sérums prélevés entre le 9-e et le 19-e jour de maladie
G = sérums prélevés après le 19-e jour de maladie
H = sérums prélevés dans une période non-précisée de maladie

Des données du tableau I il résulte:

1. Des 58 sérums avec test HFT positif, 51 (88%) sont des sérums provenant des malades de HV, saignés au cours des premiers 12 jours de l'apparition de l'ictère (ils s'encadrent par conséquent dans les limites établies (2)).

Dans 7 cas la réaction HFT a été positive même après le 12-e jour d'ictère, comme suit:

a) 2 cas le 13-e jour d'ictère.
b) 3 cas le 21-e jour d'ictère
c) 1 cas le 23-e jour d'ictère
d) 1 cas le 31-e jour d'ictère (forme prolongée de HV).

La réaction positive enregistrée pour les cas dépassant de beaucoup 12 jours d'ictère pourrait soulever le problème de l'existence d'un état de porteur (temporaire) de virus (2), particulièrement chez le malade indiqué au point d, avec forme prolongée de HV.

En ce qui concerne l'utilité réelle du test HFT pour le diagnostic de la HV, nous considérons nécessaire de relater

le cas No. 1. L'enfant I. R., âgé de 3 ans et 6 mois, présentant un sous-ictère et ascite, installés 7 jours avant l'hospitalisation et des tests de disprotéinémie positifs. Ces données nous font appréhender la possibilité d'une cirrhose ascitogène. L'agglutination HFT nettement positive nous a déterminés à revoir le diagnostic présomptif et à admettre le diagnostic de HV, forme clinique ascitogène. L'évolution ultérieure du cas a confirmé ce diagnostic.

2. Des 38 sérums à test HFT négatif, 32 (84%) provenaient comme nous nous attendions de malades de HV se trouvant avant le 9-e jour d'ictère. Pour 6 cas (16%) la réaction HFT a été négative avant le 9-e jour d'ictère, comme suit:

a) 2 cas le 4-e jour d'ictère
b) 1 cas le 5-e jour d'ictère
c) 3 cas le 6-e jour d'ictère

Les réactions négatives, enregistrées avant le 9-e jour d'ictère soulèvent deux questions: correspondent-elles vraiment à la réalité, c'est-à-dire s'agit-il d'une disparition précoce du virus ou d'un autre facteur inconnu du sang, ou bien les indications données par les malades sur le jour du début de l'ictère sont-elles inexactes?

Mentionnons enfin que les résultats du test HFT obtenus pour les cas de HV confirmés, n'ont présenté aucune corrélation avec la forme clinique de la maladie (tableau I); de même, nous n'avons réussi à observer aucune relation entre les résultats et l'âge ou le sexe des malades.

II. *L'agglutination* HFT *chez les sujets suspects de* HV, *infirmés à l'hopital.* Chez les 28 malades internés comme suspects de HV et infirmés dans le service, le test HFT a été négatif. Pour ces malades, les diagnostics définitifs ont été les suivants:

hépatite toxique	1 cas
leptospirose	2 cas
ictère mécanique (néoplasme, lithiase)	6 cas
hépatite chronique	1 cas
cirrhose hépatique	1 cas
colécystite et dyskinésie des voies biliaires	6 cas

péritonite bacillaire	1 cas
pneumonie lobaire	1 cas
bronchectasie	1 cas
infection aiguë des voies respiratoires supérieures	1 cas
leucose aiguë	1 cas

Très significatif nous a paru le résultat du test HFT chez

le cas No. 2. Le malade Z.D., 48 ans, interné comme suspect de HV, présentant un ictère intense, état sous-fébrile et tests de disprotéinémie positifs. La réaction HFT, effectuée le 7-e jour après l'apparition de l'ictère et 3 jours après l'entrée à l'hôpital, a été négative. Ce fait nous a déterminés à donner une plus grande extension aux investigations cliniques et de laboratoire, fait qui nous a permis d'infirmer le diagnostic de HV et de poser un diagnostic de leptospirose (le malade provenait d'un foyer de leptospirose, le résultat de la réaction d'agglutination pour leptospires s'avérant fortement positif).

3. *L'agglutination* HFT *dans d'autres maladies.*

A l'aide de la réaction HFT on a examiné un nombre de 26 malades avec les diagnostics suivants:

a) *viroses:*	méningite choriolymphocytaire	1 cas
	rougeole	1 cas
	oreillons	3 cas
	grippe	1 cas
b) *infections bactériennes :*		
	érysipèle	1 cas
	scarlatine	5 cas
	infection colibacillaire	1 cas
	toxi-infection alimentaire	2 cas
	dysenterie	3 cas
	adénopathie tbc. évolutive	1 cas
c) *parasitose :*	trichocéphalose	1 cas
d) *autres maladies :*		
	syndrome allergique cutané	1 cas
	lymphogranulomatose maligne	1 cas
	lupus érythémateux	1 cas
	gastrite aiguë	1 cas
	cancer pulmonaire	1 cas
	cancer gastrique	1 cas

Pour tous les cas, l'agglutination HFT a été négative.

L'absence des malades de mononucléose infectieuse (voir note II) nous a empêchés de contrôler la valeur du test HFT dans de tels cas.

Enfin, nous considérons nécessaire de rappeler que nous avons exécuté le test HFT dans 3 cas de rechute de HV. Pour 2 cas la réaction a été négative et pour l'autre faiblement positive. Dans ce dernier cas il s'agissait d'une infirmière de la section d'hépatite qui a fait deux rechutes. L'agglutination HFT a été faiblement positive le 9-e jour à partir de l'installation de la seconde rechute ce qui a posé le problème de l'éventualité d'une nouvelle infection (professionnelle) due à un type de virus de l'hépatite différent du premier, ou bien celui de la possibilité d'être porteur de virus de la primo-infection.

CONCLUSIONS

L'application de l'agglutination HFT dans la clinique de Maladies infectieuses s'est avérée, lorsqu'elle est positive dans la période initiale, utile pour le diagnostic positif et différentiel de l'hépatite virotique. La réaction HFT effectuée dans cette période et corroborée aux autres moyens de diagnostic, peut fournir des indications précieuses pour un diagnostic d'hépatite virotique. Ce test ne peut remplacer les épreuves hépatiques usuelles, vu qu'il ne semble pas refléter l'état fonctionnel du foie, tellement important pour établir l'évolution d'une hépatite virotique.

Bien que non-spécifique, l'agglutination HFT semble toutefois suffisamment caractéristique pour que son application dans les cas supposés d'hépatite virotique soit justifiée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Weinbach, R. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1961, **20**, 239.
2. Weinbach, R. Moldovan, N. et Steresco P. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1961, **20**, 249.

АГГЛЮТИНАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, ОБРАБОТАННЫХ ФОРМАЛИНОМ И ТАНИНОМ, В ПРИСУТСТВИИ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ СЫВОРОТОК (АГГЛЮТИНАЦИЯ ФТЭ)

III. ЗНАЧЕНИЕ ТЕСТА ФТЭ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Тест ФТЭ проводился у 144 больных, которых можно разделить на 3 группы:
1-ая группа — 96 подтвержденных случаев вирусного гепатита (ВГ);
II-ая группа — 22 случая, принятые в больницу как подозрительные на гепатит, но не подтвержденные в больнице и
III-тья группа — 26 случаев других разных заболеваний, служивших в качестве контролей.

Полученные результаты выяснили, что агглютинация ФТЭ была отрицательной у II-ой и III-ей группы и, следовательно, данная реакция применима в инфекционной клинике для положительной и дифференциальной диагностики В.Г., при котором она является положительной.

Проведение реакции ФТЭ в этом периоде и ее сопоставление в начальном периоде с остальными способами диагностики, может дать ценные указания для поставления диагноза вирусного гепатита. Этот тип не может заменить общепринятые пробы функции печени, ибо он не отражает функциональное состояние печени, имеющее большое значение для оценки течения вирусного гепатита. Несмотря на то, что агглютинация ФТЭ неспецифична, кажется, что она довольно характерна для вирусного гепатита, что и оправдывает ее введение в клинику.

DIE AGGLUTINATION TANNINVORBEHANDELTER MENSCHLICHER FORMOLERYTHROCYTEN DURCH HUMANSERA (TFE-AGGLUTINATION)

III. DER DIAGNOSTISCHE WERT DES TFE-TESTES BEI VIRUSHEPATITIS (VH).

ZUSAMMENFASSUNG

144 Patienten wurden mit dem TFE-Test untersucht. Dieses Krankenmaterial läßt sich in 3 Gruppen aufteilen, u.zw.:
— 1. Gruppe: 96 sichere Virushepatitis (VH)-Fälle;

— 2. Gruppe: 22 im Krankenhaus als VH-verdächtig aufgenommene Fälle, die sich jedoch letzten Endes als andersartige Erkrankungen erwiesen, und

— 3. Gruppe: 26 Fälle mit verschiedenen Erkrankungen.

Das Ergebnis der TFE-Agglutination war bei den Patienten der 2. und 3. Gruppe durchwegs negativ, während die Reaktion im Frühstadium der VH-Fälle positiv ausfiel, was zur Diagnose und Differentialdiagnose der VH beiträgt.

Zusammen mit anderen diagnostischen Hilfsmitteln, kann die TFE-Agglutination — wenn zu Beginn der VH angewandt — wertvolle Hinweise für die Diagnosestellung liefern. Der TFE-Test kann die für die Prognose einer VH so wichtigen üblichen Leberfunktionsproben nich ersetzen, da er keine Rückschluß auf die Funktion der Leberzelle zuläßt. Trotz ihrer Unspezifität scheint die TFE-Agglutination hinreichend charakteristisch für die VH zu sein, um eine Einführung dieser Reaktion in der Klinik zu rechtfertigen.

THE AGGLUTINATION OF TANNED FORMOLIZED HUMAN ERYTHROCYTES BY HUMAN SERA (TFE-AGGLUTINATION)

NOTE III. THE VALUE OF THE TFE TEST IN THE DIAGNOSIS OF VIRUS HEPATITIS

SUMMARY

The TFE-test was performed in 144 patients who may be divided into 3 groups:

Group I — 96 confirmed cases of virus hepatitis (VH)

Group II — 22 case admitted to hospital for being suspected of hepatitis, but in whom the diagnosis was subsequently disproved, and

Group III — 26 cases of various other diseases which were used as controls.

Since the result of the tests were negative in groups II and III, TFE-agglutination may be applied in the clinic of infectious diseases for the diagnosis and differential diagnosis of HV in which it yields positive results during the initial period. When performed during this period and corroborated by the other diagnostic means, it may afford a valuable indication for stating the diagnosis of virus hapatitis. This test cannot substitute the current hepatic tests since it does not express the functional condition of the liver, which is of paramount importance for an estimation of the subsequent course of virus hepatitis. In spite of its lack of specificity, TFE-agglutination appears to be sufficiently characteristic of virus hepatitis to justify the introduction of this test into clinical practice.

RECHERCHES SUR LE COMPORTEMENT DE DEUX LIGNÉES DE SOURIS, VIS-À-VIS DE VACCINS TYPHIQUES VIVANTS OU TUÉS

NOTE

par

MARCELA NICOLESCO

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Laboratoire du Vaccin T.A.B.)

— Manuscrit reçu le 13 août 1960 —

En vue d'étudier les souches de *S. typhi* servant à la préparation du vaccin T.A.B., on effectue une série d'examens, dont les plus importants sont les tests d'immunogénéité, toxicité et virulence pour la souris.

Selon certains auteurs, le test de virulence pour la souris reflète la virulence relative pour l'homme des souches typhiques (2,3), fait qui concorde avec les opinions antérieures de GRINNEL (4), PERRY et BENSTED (5), qui ont constaté que la souris est l'animal d'expérience le plus indiqué pour la recherche des caractères d'immunogénéité et de virulence des souches de *S. typhi*.

Toutefois, dans les expériences avec *S. typhi*, la souris présente deux inconvénients:

— étant donné que *S. typhi* n'est pas un agent naturellement pathogène pour la souris, cette dernière est peu sensible à l'action léthale du germe et de ses produits;

— le fait que la souris peut être porteur d'autres *Salmonella* (ex.: *S. E. Gärtner* et *S. typhi murium*, pathogènes pour cet animal), conduit parfois à des résultats erronés.

Afin d'améliorer dans une certaine mesure, ce dernier inconvénient, on a essayé de remplacer la lignée H des souris blanches (provenant de Tchécoslovaquie) par des souris beiges DBAO (reçues de Hongrie), vu que ces dernières présentent une mortalité très réduite parmi les souris normales.

Les souris beige DBAO représentent une sélection de la lignée C57, qui est utilisée pour le test de l'action des substances chimiques et des antibiotiques dans la Tbc. expérimentale, ainsi que pour la détermination du pouvoir antigénique des vaccins anti-typhiques (1).

Dans le présent travail, on a effectué parallèlement des tests de virulence, toxicité et immunogénéité de certaines souches de *S. typhi* sur des groupes de souris, lignées H et DBAO en utilisant les doses indiquées dans les instructions de préparation du vaccin T.A.B. de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino ».

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

1. *Souris.* On a utilisé 720 souris (360 de chaque lignée).

Pendant la période précédant les expériences, on a constaté que d'un lot de 414 souris blanches (dont on avait choisi les 360 destinées aux recherches)

25 (17%) sont mortes; à l'autopsie, on a isolé des *Salm. E. Gärtner* dans 7 cas et des *S. typhi murium* dans 5 cas. D'un lot de 605 souris beiges (DBAO) (dont on a choisi les 360 nécessaires aux expériences), seulement deux sont mortes (0,31%); à l'autopsie aucun germe n'a été isolé.

2. *Les souches de S. typhi* utilisées étaient: des souches indigènes et la souche standard «Ty_2». En vue d'obtenir des résultats homogènes, on a inoculé la même suspension de chaque souche de *S. typhi*, au groupe de souris blanches, ainsi qu'aux souris beiges (DBAO).

3. *Pour la détermination de la virulence*, on a utilisé des lots de souris de 16 17 g, auxquelles on a inoculé, par voie intrapéritonéale, 0,5 ml suspension vivante de *S. typhi* en doses de 100, 200 et 300 millions germes (5 souris par dose), tenues sous observation pendant 72 heures.

4. *Pour le test de toxicité* on a inoculé par voie intrapéritonéale, à des souris pesant 18 à 20 g, 0,5 ml suspensions de *S. typhi* tuées par chaleur (1 heure à 58°C), en doses de 500 millions et 1 milliard germes (5 souris par dose, observation 72 heures).

5. *L'épreuve de l'immunogénéité* a été effectuée avec les mêmes suspensions que celles utilisées pour la recherche de la toxicité. La vaccination a été pratiquée par deux inoculations sous-cutanées, à intervalles de 7 jours, en administrant en tout 200 millions germes, à des souris pesant 14 à 16 g; 10 jours après la dernière inoculation, les souris vaccinées, ainsi que le lot témoin, ont reçu une dose limite mortelle (DLM). La lecture a été faite après 72 heures.

RÉSULTATS

A. — Les résultats du test de virulence sont consignés dans le tableau I. On a déterminé la virulence de 6 souches de *S. typhi*, dont 5 souches indigènes et la souche standard « Ty_2 ».

Tableau I

Test de virulence

Souche	souris blanches			souris beiges		
	dose en millions germes					
	100	200	300	100	200	300
S.T. 36	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
S.T. 37	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
S.T. 38	2/5	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5
S.T. 62	2/5	3/5	4/5	4/5	5/5	4/5
S.T. 63	2/5	3/5	4/5	5/5	4/5	5/5
	75	100	125	75	100	125
S.T. Ty	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Total mortes / inoculées	15/30	19/30	23/30	24/30	24/30	24/30

Il ressort de ce tableau que les souris beiges (DBAO) testées pour la virulence, ont généralement présenté une mortalité plus élevée que les souris blanches.

B. — Les résultats de l'épreuve de toxicité sont présentés dans le tableau II. Pour ce test, on a utilisé 6 suspensions de souches de b. typhiques indigènes.

Tableau II

Test de toxicité

Souche	souris blanches		souris beiges	
	dose en millions germes			
	500	1000	500	1000
S.T. 14	2/5	2/5	0/5	4/5
S.T. 15	1/5	1/5	0/5	0/5
S.T. 16	0/5	4/5	0/5	0/5
S.T. 18	1/5	2/5	0/5	0/5
S.T. 26	2/5	2/5	0/5	1/5
S.T. 27	0/5	0/5	0/5	0/5
Total mortes/inoculées	6/30	11/30	0/30	5/30

Il résulte de ce tableau qu'à l'épreuve de toxicité, les souris beiges se montrent plus résistantes que les souris blanches.

C. — L'épreuve d'immunogénéité a été effectuée à l'aide de 9 souches de *S. typhi* indigènes.

Les résultats sont inscrits dans le tableau III.

Tableau III

Test d'immunogénéité

Souche	Souris blanches			Souris beiges		
	% protection	1/2 DLM	1 DLM	% protection	1/2 DLM	1 DLM
		Témoins			Témoins	
S.T. 13	50	6/7	10/10	7	5/5	10/10
S.T. 14	42	,,	,,	7	,,	,,
S.T. 15	50	,,	,,	28	,,	,,
S.T. 16	17	,,	,,	0	,,	,,
S.T. 18	46	,,	,,	7	,,	,,
S.T. 26	23	,,	,,	0	,,	,,
S.T. 27	30	,,	,,	13	,,	,,
S.T. 28	50	,,	,,	20	,,	,,
S.T. 29	28	,,	,,	7	,,	,,
Total % protection	37,3			9,9		

Ce tableau montre que les souches de *S. typhi* examinées sont, en général, faiblement immunogènes. Cependant, lors des tests effectués sur souris blanches, trois des souches ont présenté des pourcentages de protection satisfaisante de

50%, le reste variant entre 17 et 46%, ce qui permet une sélection des souches du point de vue de l'immunogénéité.

Les mêmes souches de *S. typhi* testées sur souris DBAO présentent des pourcentages de protection sensiblement inférieurs. Une seule souche a protégé 28% et le reste entre 0—20% des souris. Les pourcentages de protection obtenus sur les souris DBAO sont si réduits que l'on ne peut faire une sélection entre les souches à l'aide du test d'immunogénéité.

La moyenne des pourcentages de protection des épreuves exécutées sur souris blanches et beiges, ont donné des chiffres de 37,7% et 9,9% respectivement.

DISCUSSION

Les épreuves de virulence, toxicité et immunogénéité ont révélé un comportement différent des deux lignées de souris (lignée H et DBAO).

Analysant le résultat total du test de virulence, on a constaté que chez la souris blanche, la mortalité, augmentant en fonction de la dose inoculée, est inférieure à celle des souris beiges, qui présentent le même taux de mortalité pour toutes les doses administrées. Contrôlant les résultats obtenus avec chaque souche de *S. typhi* séparément, on constate une réaction identique chez les deux lignées de souris, lorsqu'il s'agit d'une souche très virulente ou avirulente (T.36 et T.37).

Les souris beiges se sont montrées plus résistantes que les souris blanches à l'épreuve de toxicité — en doses de 500 millions germes, aussi bien qu'en dose de 1 milliard germes.

Des expériences sur la virulence et la toxicité, il ressort que chez la souris blanche la limite entre ces deux épreuves est moins nette que chez la souris beige (DBAO); d'autre part, le fait que les souris DBAO présentent une mortalité si élevée vis-à-vis de petites doses de germes vivants, alors qu'elles sont résistantes à des doses de 5 à 10 fois plus fortes de germes tués, prouverait que ces deux tests — virulence et toxicité — sont totalement différents, pouvant être séparés.

Ainsi qu'il a été montré au début de cette note, les doses de vaccins utilisées pour les inoculations sont celles recommandées par les instructions de préparations du vaccin T.A.B. de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino », similaires aux doses universellement employées par tous les auteurs.

Les résultats de l'épreuve d'immunisation active montrent que, contrairement aux recommandations de DUMAS, les souris DBAO ne peuvent servir au titrage du pouvoir antigénique du vaccin anti-typhique, ni au titrage de la virulence des souches de *S. typhi*. Afin d'établir s'il s'agit d'un manque total de réponse à l'immunisation ou si la dose infectante est trop forte pour cette lignée (DBAO), nous considérons qu'il serait éventuellement nécessaire d'utiliser des souris d'un poids plus grand ou de modifier les doses vaccinantes et infectantes. Il faudrait de même tester les effets des inoculations par d'autres voies, étant donné que SACQUET (6) par inoculation intracérébrale de *S. typhi* Ty_2 a trouvé des différences beaucoup plus marquées des diverses lignées de souris, que par inoculation intrapéritonéale. Jusqu'à l'éclaircissement de ce problème, les souris DBAO pourront être utilisées pour la détermination de la toxicité des vaccins typhiques avec plus de succès que les souris blanches.

CONCLUSIONS

1. Les souris beiges (DBAO) se sont montrées moins résistantes au test de virulence que les souris blanches, pour des doses équivalentes.

2. Les souris beiges sont par contre plus résistantes à l'épreuve de toxicité que les souris blanches.

3. Pour le test d'immunisation active, les souris beiges ont donné des pourcentages de protection très réduits, en comparaison avec les souris blanches.

4. Des faits exposés, il résulte que les souris DBAO ne peuvent servir, dans les conditions données (souches et concentration des vaccins), que pour la détermination du test de toxicité.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dumas J. — Les animaux de laboratoire. Coll. Institut Pasteur, Paris, Ed Méd. Flammarion, 1953.
2. Felix A. et Anderson E. S. — J. Hyg., Cambridge, 1951. **49**, 349.
3. Findlay H. T. — J. Hyg., Cambridge, 1951. **49**, 111.
4. Grinnel F. — J. exp. Medicine, 1932. **56**, 907.
5. Perry H. M., Findlay H. T. et Bensted H.J. — J. Royal Army Med. Corps, 1933, **9**, 241.
6. Sacquet E. — Ann. Institut Pasteur, 1960. **98**, 880.

ИЗУЧЕНИЕ ПОВЕДЕНИЯ ДВУХ РАЗНЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ЖИВЫМ И УБИТЫМ ТИФОЗНЫМ ВАКЦИНАМ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Коричневые мыши D.B.A.O. оказались менее устойчивыми в испытании вирулентности, чем белые мыши.

2. При испытании токсичности коричневые мыши оказались устойчивее белых мышей.

3. При испытании активного иммунитета коричневые мыши оказались защищенными в очень малых процентах, по сравнению с белыми мышами.

4. Вследствие вышеуказанных обстоятельств мышей D.B.A.O. следует применять только для пробы на токсичность, при работе с тифозными штаммами и вакцинами, в указанных концентрациях.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VERHALTEN VON ZWEI VERSCHIEDENEN MÄUSERASSEN GEGENÜBER LEBENDEN ODER ABGETOTETEN TYPHUS IMPFSTOFFEN

ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Virulenztest weisen hellbraune D.B.A.O. Mäuse eine geringere Widerstandsfähigkeit auf als weisse Mäuse.

2. Im Toxizitätstest sind hellbraune Mäuse widerstandsfähiger als weisse.

3. Im aktiven Immunisierungstest wiesen, hellbraune Mäuse, im Vergleich mit weisssen, sehr niedrige Schutzprozentsätze auf.

4. Aus diesen Angaben folgt, dass D.B.A.O. Mäuse nur bei der Durchführung des Toxizitätstests verwendet werden können, sofern mit Typhusbazillenstämmen und — Impfstoffen in den angeführten Konzentrationen gearbeitet wird.

INVESTIGATIONS CONCERNING THE BEHAVIOUR OF TWO DIFFERENT LINES OF MICE *VERSUS* LIVE OR KILLED TYPHOID VACCINES

SUMMARY

1. In the virulence test, D.B.A.O. beige mice exhibited a lower degree of resistance than albino-mice.

2. In the toxicity test, beige mice are more resistant than albino-mice.

3. In the active immunization test, beige mice yielded very low percentage rates as compared to albino-mice.

4. It follows from these findings that in experiments with typhoid strains and vaccines in the concentrations reported, D.B.A.O. mice should only be used for toxicity determinations.

ÉTUDE CHIMIQUE DES ANTIGENES EXTRAITS DE DIFFÉRENTS TYPES DE MÉNINGOCOQUES

par

EUGENIA PODHORSKI-COSTIN et AURICA TOPCIU

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Services de Biochimie générale et des Cocci pathogènes)

— Manuscrit reçu le 30 juillet 1960 —

Le problème de la constitution chimique des antigènes bactériens préoccupe depuis longtemps les auteurs. La littérature de spécialité offre peu de données sur la constitution chimique des antigènes extraits du méningocoque, la plupart se référant uniquement aux méthodes d'extraction des antigènes, surtout des haptènes, et à l'étude chimique de ces derniers.

En 1938, — par la technique BOIVIN et coll. (3) — CHEVÉ, en France (6), CIUCĂ, SORU et coll (7), SORU et TOPCIU, en 1945, en Roumanie (13) ont extrait du méningocoque un antigène glucido-lipidique, qui ne s'obtenait qu'en très petite quantité, ne pouvant par conséquent répondre aux nécessités pratiques. JYSSUM (9) a extrait de 3 souches de méningocoque des fractions protéiques et polysaccharidiques. Ces auteurs ont également étudié l'activité précipitante de ces antigènes par diffusion en gel, ainsi que leur capacité de sensibiliser les hématies pour l'agglutination par les sérums anti-méningococciques. En 1958, WATSON et coll. (17, 18) ont préparé un haptène spécifique du groupe C, établissant également sa nature chimique.

En 1959, SORU et TOPCIU (14) ont isolé de différents types de méningocoques (A, B et C) un composant à caractère antigénique, en appliquant à ces germes une technique utilisée antérieurement pour d'autres bactéries (15). Les résultats obtenus avec ce produit « in vivo» et « in vitro» ont montré qu'il s'agit d'un antigène complet (14).

Dans le présent travail, nous exposons les résultats concernant l'étude de la composition chimique de cet antigène.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour l'extraction de l'antigène, on a utilisé les souches suivantes: type A (52137); B (52147) et C (52142), reçues de l'Institut Pasteur de Paris en 1957.

Cultures microbiennes. Les germes utilisés pour l'extraction du complexe antigénique ont été obtenus d'une culture de 18—20 heures, incubée à 37° sur gélose peptonée (macéré de viande avec glucose 2‰, pH = 7,6) distribuée en boîtes Roux. L'inoculum est constitué de cultures sur gélose-ascite des souches mentionnées. Les germes cultivés dans les conditions décrites sont suspendus en

solution saline (NaCl 0,8%) et séparés par centrifugation; le dépôt microbien, lavé 2 à 3 fois à l'eau bidistillée, séché à l'acétone et ensuite à l'éther, est maintenu dans l'exsiccateur à vide. Sous cette forme, les germes peuvent être conservés longtemps sans altération de l'antigène.

L'extraction du complexe antigénique a été faite selon la technique appliquée pour le méningocoque par SORU et TOPCIU (14).

Déterminations chimiques. L'antigène isolé suivant la technique décrite a été analysé du point de vue chimique, en déterminant le résidu minéral; les substances organiques; les lipides totaux; les substances réductrices, avant et après hydrolyse (exprimées en glucose); les acides nucléiques totaux; l'acide désoxyribonucléique et l'acide ribonucléique; le phosphore total, le phosphore acidosoluble, le phosphore nucléique; l'azote total, l'azote acidosoluble, l'azote nucléique, l'azote aminique total et l'azote aminique polypeptidique. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau I.

RÉSULTATS

Résidu mineral (cendre): déterminé par minéralisation du poids constant de 0,1g antigène sec. Les résultats obtenus montrent de très grandes différences selon la souche examinée. L'antigène isolé du méningocoque type A avait la valeur la plus réduite: 8,08 g pour 100 g antigène sec; l'antigène isolé du méningocoque type B, une valeur intermédiaire: 12,50 g pour 100 et l'antigène isolé du méningocoque de type C, la plus grande valeur: 24,40 g pour 100.

Les substances organiques, calculées par la différence entre le résidu total et le résidu minéral correspondant: pour le type A — 91,92 g pour 100, pour le type B — 87,50 g pour 100 et pour le type C — 75,60 g pour 100 (Tableau I).

Lipides totaux: ont été déterminés par extraction à l'éther des hydrolysats des solutions d'antigène (ClH N/1, 5 heures à 100°C), évaporation de l'éther et pesage du résidu. La couche liquide débarrassée des lipides est utilisée pour le dosage des substances réductrices. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de différences dans le contenu en lipides des antigènes type A et B, la moyenne des valeurs étant de 5,20 g pour 100 g antigène sec; des valeurs légèrement réduites ont été constatées pour le type C: 4,47 g pour 100 (Tableau I).

Substances réductrices: les substances réductrices ont été déterminées avant et après hydrolyse, par la méthode classique de HAGEDORN-JENSEN. Avant l'hydrolyse, elles se trouvent en plus grande proportion dans l'antigène extrait du type B: 6,10 g pour 100 g antigène sec; les antigènes de types A et C ne présentent aucune différence, la moyenne des valeurs étant de 5,6 g pour 100 pour les deux antigènes. Les substances réductrices totales, déterminées après l'hydrolyse des antigènes extraits des types B et C, ne présentent pas de différences importantes, la moyenne des valeurs étant 15,72 g pour 100 g antigène sec; on a obtenu toutefois des valeurs plus augmentées chez l'antigène extrait du type A, —20,04 g pour 100 (Tableau I).

Les acides nucléiques totaux ont été dosés par la méthode préconisée par SCHNEIDER (12) pour les tissus et adaptée par VENDRELY et KRUGER (16, 10) pour le dosage des acides nucléiques des bactéries. La méthode consiste dans: la libération des bases puriniques des acides nucléiques par hydrolyse acide (ClH N/1, 2 heures à 100°C) des extraits trichloracétiques à chaud (90°), la

Tableau I

Grammes pour 100 g antigène sec

Antigènes étudiés	Souche type A (52137)	Souche type B (52147)	Souche type C (52142)
Rendement de l'extraction des antigènes pour 100 g des germes	22,30	26,13	16,78
Composants			
I Résidu minéral	8,08	12,50	24,40
II. Substances organiques	91,92	87,50	75,60
III. Lipides totaux	5,10	5,30	4,47
IV. Substances réductrices avant l'hydrolyse (exprimées en glucose)	5,61	6,10	5,52
Substances réductrices totales (exprimées en glucose)	20,04	15,11	16,34
V. Acides nucléiques totaux	25,20	40,10	24,05
Acide désoxyribonucléique	2,56	3,70	1,90
Acide ribonucléique	22,64	36,40	22,15
Rapport $\frac{\text{acide désoxyribonucléique}}{\text{acides nucléiques totaux}}$	0,10	0,09	0,08
VI. Phosphore total	4,10	5,06	3,13
Phosphore acido-soluble	1,50	1,05	0,85
Phosphore nucléique	2,50	4,00	2,30
VII. Azote total	11,02	10,87	8,78
Azote acido-soluble	2,78	2,30	2,10
Azote nucléique	2,60	3,90	2,50
Azote aminique total	0,382	0,308	0,108
Azote aminique libre	0,114	0,105	0,037
Azote aminique polypeptidique	0,268	0,203	0,071

précipitation des purines sous forme de sel de cuivre, la minéralisation des sels (KJELDAHL) et le dosage de l'azote puriniquc (par la méthode de distillation PARNAS-WAGNER).

L'acide désoxyribonucléique a été dosé directement sur les extraits trichlor-acétiques à chaud, selon la méthode DISCHE.

L'acide ribonucléique a été déduit de la différence entre les acides nucléi-ques totaux et l'acide désoxyribonucléique.

Les résultats obtenus montrent, en général, une abondance considérable en acides nucléiques des antigènes des méningocoques, spécialement de la souche type B: 40,10 g pour 100 g antigène sec vis-à-vis de 25,20 g pour 100 g antigène sec du type A et 24,05 g pour 100 g de l'antigène isolé du type C, ces derniers ayant par conséquent, des valeurs très rapprochées.

L'acide désoxyribonucléique se trouve en plus grande proportion dans l'an-tigène extrait du type B: 3,70 g pour 100 g antigène sec; pour le type A il présente une valeur moyenne de 2,56 g pour 100 et pour le type C, une valeur beaucoup plus petite: 1,90 g pour 100. Etant donné que le taux de l'acide ribonucléique est obtenu par la différence entre les acides nucléiques totaux et l'acide désoxy-ribonucléique, il résulte qu'au type B correspond 36,40 g pour 100 g d'antigéne et aux types A et C une moyenne de 22,39 pour 100 (Tableau I).

Considérant le rôle prépondérant des acides nucléiques (5) les discordances constatées par nous en ce qui concerne le contenu si différent en acides nucléi-ques de l'antigène isolé du méningocoque type B, vis-à-vis de celui des antigènes

isolés des types A et C, pourraient, très probablement, avoir une signification spéciale.

Le phosphore a été déterminé selon la méthode de BELL et BRIGGS (1,2): le phosphore total (sur 0,005 g antigène sec); le phosphore acido-soluble (sur l'extrait trichloracétique à froid) et le phosphore nucléique (sur l'extrait trichloracétique à chaud).

Le phosphore total montre de très grandes variations dans les antigènes extraits des trois souches; il se trouve en proportion plus grande dans l'antigène type B (5,06 g pour 100 g antigène sec); dans l'antigène extrait du type A la valeur moyenne est de 4,10g pour 100 et en proportion beaucoup plus réduite vis-à-vis des deux autres dans le type C (3,13 g pour 100). Probablement, ces différences correspondent à la différence du contenu en acides nucléiques. Le phosphore acido-soluble est de 0,85 g pour 100 g antigène sec pour le type C, avec la valeur moyenne de 1,27 g pour 100 pour les types A et B (donc une proportion beaucoup plus réduite pour le type C). Le phosphore nucléique est en proportion plus élevée chez l'antigène du type B: 4,00 g pour 100 g antigène sec, par rapport à la moyenne de 2,40 g pour 100 chez les autres deux types (Tableau I).

L'azote: L'azote total est dosé par la méthode de kjeldahlisation de l'antigéne sec; l'azote acido-soluble, par kjeldahlisation de l'extrait trichloracétique à froid, et l'azote nucléique, par kjeldahlisation de l'extrait trichloracétique à chaud et par distillation ultérieure de l'azote ammoniacal dans l'appareil Parnas-Wagner; l'azote aminique total est déterminé sur une partie de l'extrait trichloracétique à froid, selon la méthode POPE et STEVENS (11), après préalable hydrolyse de 4 heures en milieu d'acide chlorhydrique N/1; une autre partie du même extrait sert à la détermination directe de *l'azote aminique libre*, selon la méthode indiquée. La différence entre l'azote aminique total et l'azote aminique libre représente l'azote aminique polypeptidique.

L'azote total des antigènes extraits des types A et B ne montre pas de variations, la moyenne étant 10,94 g pour 100 g antigène sec; la valeur est plus petite pour l'antigène extrait du type C: 8,78 g pour 100.

L'azote acido-soluble montre des variations très petites pour les trois types, soit: 2,78 g pour 100 g antigène sec type A; 2,30 g pour 100 g antigène type B et 2,10 g pour 100 g antigène type C. L'azote nucléique montre de très petites variations pour les types A et C, la moyenne des valeurs étant 2,55 g pour 100 g antigène sec; la proportion est plus grande pour l'antigène du type B: 3,90 g pour 100.

L'azote aminique total présente également de très petites variations pour les types A et B: 0,382 g pour 100 g antigène sec, type A, et 0,308 g pour 100 g type B; il est en plus petite proportion dans l'antigène type C: 0,108 g pour 100, ce qui représente une baisse d'environ 30% vis-à-vis des types A et B.

L'azote aminique libre ne montre pas de variations dans les antigènes extraits des types A et B, la moyenne des valeurs étant 0,109 g pour 100 g antigène sec; il est en proportion bien plus petite dans le type C: 0,037 g pour 100.

L'azote aminique polypeptidique, obtenu par la différence entre l'azote aminique total et l'azote aminique libre, garde les mêmes proportions pour les types A et B, la moyenne étant 0,235 g pour 100 g antigène sec; il est très réduit pour le type C, dont la valeur est 0,071g pour 100.

Les résultats des déterminations exprimées en g pour 100g antigène sec, indiqués dans le tableau I, représentent la moyenne de quatre séries de déterminations.

CONCLUSIONS

La composition chimique des antigènes extraits de 3 souches de méningocoque de différents types (A, B et C) a été analysée en déterminant le résidu minéral, les substances organiques, les lipides totaux, les substances réductrices avant et après hydrolyse (exprimées en glucose), les acides nucléiques totaux, les acides désoxyribonucléiques et ribonucléiques, l'azote total, l'azote acido-soluble, l'azote nucléique, l'azote aminique total, l'azote aminique libre et l'azote aminique polypeptidique.

Le maximum de rendement est présenté par le type B: 26,13 g antigène pour 100 g germes, suit le type A: 22,30 g pour 100; le rendement le plus réduit étant obtenu chez le type C: 16,78 g pour 100.

En ce qui concerne la proportion des différents composants chimiques déterminés sur les antigènes extraits de 3 types de méningocoques, on constate des différences quantitatives appréciables et, en général, une abondance en acides nucléiques des méningocoques et spécialement de la souche type B.

L'antigène extrait du type A, en comparaison avec les antigènes isolés des types B et C, est pauvre en sels minéraux, mais plus riche en substances réductrices totales, exprimées en glucose et quelques fractions azotées.

L'antigène extrait du type B *est très riche en acides nucléiques totaux (acides désoxyribonucléiques et ribonucléiques)*, comparativement aux antigènes extraits des types A et C; *il est également riche en phosphore total, phosphore nucléique et azote nucléique*. Les autres composants chimiques présentent des valeurs intermédiaires entre les valeurs trouvées chez les types A et C.

L'antigène extrait du type C est très riche en sels minéraux et pauvre en phosphore et certaines substances azotées, surtout en azote aminique total, libre et polypeptidique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bell, R.D. et Doisy E.A. — J. Biol. Chem., 1920, **49**, 55.
2. Briggs A. — J. Biol. Chem., 1922, **53**, 13.
3. Boivin A et Mesrobeanu L. — C. R. Soc. Biol, 1933, **112**, 76, 1009.
4. Boivin A., Vendrely R. et Tulasne R. — Bull. Ac. Méd., 1947, **131**, 39,
5. Cepinoga O.D. — Les acides nucléiques et leur rôle biologique, Ed. Méd. Bucarest, 1958.
6. Chevé J. — C. R. Ac. Sci., 1938, **206**, 1024.
7. Ciucă M., Soru E. et coll. — C.R. Soc. Biol., 1939, **130**, 322.
8. Costin-Podhorski E. et Topciu A. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 155.
9. Jyssum K. — Acta Pathol. et Microbiol. Scand., 1958, **42**, 216.
10. Kruger N. et Schmidt G. — Ztschrft. Physiol. Chem., 1905, **8**, 1.
11. Pope C.G. et Stevens M.F. — Biochem. J., 1939, **33**, 1070.
12. Schneider W.C. — J. Biol. Chem., 1945, **161**, 293.
13. Soru E. et Topciu A. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1945—1947, **14**, 83.
14. Soru E et Topciu A. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 541.
15. Soru E., Barber C. et coll. — C.R. Soc. Biol., 1956, **101**, 2187.
16. Vendrely R.M. — « Un symposiom sur les protéines », 1946, Ed. Masson et Cie, Paris.
17. Watson R.G. et Scherp H.W. — J. Immunol., 1958, **81**, 331.
18. Watson R.G., Marinetti G.V. et Scherp H.W. — J. Immunol, 1958, **81**, 337.

ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕНОВ, ВЫТЯНУТЫХ ИЗ РАЗНЫХ ТИПОВ МЕНИНГОКОККОВ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Анализировали химический состав антигенов, вытянутых из 3 штаммов менингококков, принадлежащих к разным типам (A, B, и C), причем определяли следующие составные части: минеральный остаток, органические вещества, общие жиры, восстановительные вещества перед и после гидролиза (выраженные в эквиваленте глюкозы), общие нуклеиновые кислоты, дезоксирибонуклеиновую и рибонуклеиновую кислоту, общий азот, кислоторастворимый азот, нуклеиновый азот, общий аминный азот, свободный аминный азот и аминный азот полипептидов.

Тип B дает максимальный выход :26,13 гр. антигена на 100 гр. микробных тел; за ним следует тип A: 22,30 гр.%, тип C дает наиболее низкий выход — 16,78 гр.%.

Что касается соотношения между разными химическими компонентами, определенными нами в антигенах экстрагированных из 3 типов менингококков, то установлены значительные количественные различия; в общем, отмечается значительная обильность нуклеиновых кислот у менингококков, особенно у штамма B.

По сравнению с антигенами, выделенными из типа B и C, антиген, выделенный из типа A, содержит скудное количество минеральных солей, но он богаче общими восстановительными веществами, выраженными в единицах глюкозы и некоторыми азотистыми фракциями.

Антиген, экстрагированный из типа B, очень богат общими нуклеиновыми кислотами (дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислотой) по сравнению с антигенами, выделенными из типов A и C; он содержит также повышенные количества общего фосфора, нуклеинового фосфора и нуклеинового азота. Остальные химические компоненты находятся в количествах, занимающих промежуточное место между цифрами, найденными у типов A и C.

Антиген, экстрагированный из типа C очень богат минеральными солями, однако он содержит скудное количество фосфора и некоторых азотистых веществ, особенно общего свободного и полипептидного аминного азота.

CHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER AUS VERSCHIEDENEN MENINGOKOKKEN-STÄMMEN EXTRAHIERTEN ANTIGENE

ZUSAMMENFASSUNG

Die chemische Zusammensetzung der aus 3 Meningkokkenstämmen verschiedener Typen (A, B und C) extrahierten Antigene wurde untersucht. Die Bestimmungen betraffen die folgenden Bestandteile: Mineralrückstand, organische substanz, Gesamtfettstoffe, reduzierende Substanzen vor und nach Hydrolyse (ausgedrückt als Glukose), Gesamtnukleinsäuren, Desoxyribonuklein- und Ribonukleinsäuren, Gesamtstickstoff, säurelöslicher Stickstoff, Nukleinstickstoff, Gesamtaminostickstoff, freier Aminostickstoff und Polypeptidaminostickstoff.

Den höchsten Ertrag liefert der Typus B: 26,13 g Antigen per 100 g Keime. Es folgt Typus A mit 28,30 g%, während Typus C den niedrigsten Ertrag (16,78 g%) ergibt.

Was den relativen Anteil der verschiedenen in den aus den 3 Meningokokkentypen extrahierten Antigenen bestimmten chemischen Bestandteile betrifft, wurden bedeutende quantitative Unterschiede festgestellt. Im allgemeinen sind die Meningokken und insbesondere der Stamm B sehr reich an Nukleinsäuren.

Im Vergleich mit dem aus den Typen B und C isolierten Antigenen, ist das aus den Typus A extrahierte Antigen arm an Mineralsalzen aber reicher an gesamten reduzierenden Stoffen (ausgedrückt als Glukose) und an einigen Stickstoffverbindungen.

Das aus dem Typus B extrahierte Antigen ist im Vergleich mit den aus den Typen A und C isolierten sehr reich an Gesamtenukleinsäuren (Desoxyribonukleinsäure und Ribonukleinsäure); auch ist es reicher an Gesamtphosphor, Nukleinphosphor und Nukleinstickstoff.

Die Werte für die anderen chemischen Bestandteile liegen zwischen den bei den Typen A und C verzeichneten.

Das aus dem Typus C extrahierte Antigen ist sehr reich an Mineralsalzen und arm an Phosphor und gewissen Stickstoffverbindungen, insbesondere an Gesamtaminostickstoff, freiem Aminostickstoff und Polypeptidaminostickstoff.

A CHEMICAL STUDY OF THE ANTIGENS EXTRACTED FROM VARIOUS TYPES OF MENINGOCOCCI

SUMMARY

The chemical composition of the antigen extracted from 3 strains of meningocci belonging to the different types (A, B and C) was investigated. The following determinations were carried out: mineral residue, organic compounds, total lipids, reducing material before and after hydrolysis (expressed as glucose), total nucleic acids, desoxyribonucleic and ribonucleic acids, total nitrogen, acid-soluble nitrogen, nucleic acid nitrogen, total amino-nitrogen, free amino-nitrogen, and polypeptide amino-nitrogen.

The highest yield was obtained in type B (26.13 g. antigen per 100 g. of germs), followed by type A (22.30 g. per cent); the lowest yield was obtained in type C (16.78 g. per cent)

As regards the relative proportions of the various chemical constituents determined, considerable quantitative differences were found to exist between the antigens extracted from the 3 types of meningococci. On the whole, the meningococci, and type B in particular, displayed remarkably high nucleic acid contents.

As compared to the antigens extracted from types B and C, the antigen extracted from type A contained smaller amounts of mineral salts and larger amounts of total reducing material (expressed as glucose) and of some nitrogen compounds.

The antigen extracted from type B contains very large amounts of total nucleic acids (desoxyribonucleic and ribonucleic acids) as compared to the antigens extracted from types A and C. It also contains more total and nucleic acid phosphorus and more nucleic acid nitrogen. The figures for the chemical constituents are midway between those recorded in types A and C.

The antigen extracted from type C contains large amounts of mineral salts and little phosphorus as well as low amounts of some nitrogen compounds, total, free, and polypeptide amino-nitrogen in particular.

RECHERCHES SUR LA VALEUR DE DEUX MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES.

NOTE

par

ECATERINA ALEXENCO, COLETTE GEORGESCO et LUIZA SOARE

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Entérobactériacées)

— Manuscrit reçu le 6 décembre 1960 —

Il est connu que les recherches « in vitro » sur la sensibilité aux antibiotiques des germes microbiens s'effectuent selon différentes méthodes.

Ce fait prouve avant tout, que l'antibiogramme effectué dans les conditions actuelles de technique, sans disposer d'un test-standard, ne représente pas une analyse rigoureusement exacte, à cause des nombreux facteurs qui influencent les résultats qu'on obtient. Parmi ces facteurs il faut rappeler : le milieu de culture employé, l'espèce microbienne à tester, ses rapports écologiques qui ne doivent pas être négligés, l'antibiotique utilisé, la température, la durée d'incubation, la technique de travail, etc.

Parmi les méthodes connues il n'y a qu'un nombre réduit qui puisse couvrir toutes les exigences d'un antibiogramme idéal.

Cette situation a déterminé l'Organisation Mondiale de la Santé d'entreprendre, par le Comité d'Experts du groupe International de Recherches sur les Antibiotiques, une enquête dans la plupart des pays, basée sur un questionnaire spécialement rédigé pour mettre en évidence la méthode la plus exacte, la plus commode et la plus concordante avec les résultats cliniques, afin de la recommander éventuellement aux laboratoires qui effectuent couramment des antibiogrammes.

Les résultats de l'enquête ont montré, en premier lieu, une très grande diversité de méthodes qui sans doute ne peuvent pas toujours mener à des résultats concordants.

En Roumanie, la méthode la plus souvent recommandée est celle d'ERNA LUND, qui est une méthode diffusimétrique permettant l'obtention de résultats plus précis comparativement aux autres méthodes basées sur le même principe.

Vu que cette méthode nécessite des solutions d'antibiotiques en concentrations élevées, fraîchement préparées, ainsi que des pipettes rigoureusement vérifiées, nous nous sommes proposé d'étudier cette méthode comparativement à la méthode qui utilise des tablettes d'antibiotiques en quantités déterminées et qui présente l'avantage d'une exécution plus facile.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude a été effectuée sur 228 souches appartenant à différentes espèces microbiennes, parmi lesquelles: 120 souches de *staphylocoque*, 64 souches de *Salmonella (S. typhi, S. typhi murium, S. cholerae suis)*, 33 souches de *Shigella*, 7 souches de *Proteus* et 4 souches *d'Escherichia*, isolées de malades et de porteurs sains de différents hôpitaux.

On a testé la sensibilité de chaque souche vis-à-vis des antibiotiques suivants: pénicilline, streptomycine, chloramphénicol, auréomycine, terramycine, érythromycine, nitrofuran et sulfathiazol, comparativement par les deux techniques: la méthode d' Erna Lund et celle des tablettes.

Pour les deux méthodes on a employé le même milieu de culture (gélose 2%, pH = 7,4 — 7,6) et une quantité égale d'inoculum (dilution 10^3 de culture en bouillon de 24 heures); les antibiotiques utilisés ont été les suivants:

Méthode Erna Lund: rondelles de 15 mm diamètre, sur lesquelles on a déposé la quantité exacte de 0,05 ml de solution fraîche de chimiothérapeutiques contenant: 200 U/ml pénicilline, 10000 γ /ml streptomycine, 1000 γ /ml auréomycine, terramycine, chloramphénicol ou érythromycine, 250 γ/ml nitrofuran et 0,5 g% sulfathiazol.

A l'exception des autre substances, pour les tests au sulfathiazol, on a utilisé comme milieu de culture de la gélose 2% additionnée de 10% sang laqué de cheval, dans le but d'inhiber le facteur anti-sulfamidique du milieu.

Méthode des tablettes: tablettes de 9 mm diamètre préparées d'après la formule recommandée par l'Hôpital Central Militaire, contenant les chimiothérapeutiques suivants, incorporés dans un excipient complexe (carbonate de calcium, talc, amidon, gumma acacia et dextrine):

Pénicilline	10 U	Érythromycine	120 γ
Streptomycine	120 γ	Terramycine	120 γ
Chloramphénicol	120 γ	Nitrofuran	50 γ
Auréomycine	120 γ	Sulfathiazol	10 mg

RÉSULTATS

L'étude des rapports entre les zones d'inhibition obtenues par les deux méthodes a permis les constatations suivantes:

Les zones d'inhibition obtenues par la méthode des tablettes sont, en général, plus réduites que les zones obtenues par la méthode Erna Lund.

La moyenne des différences entre le diamètre des zones d'inhibition obtenues par les deux méthodes a varié en fonction de l'antibiotique utilisé et de la souche microbienne. En général, les différences ont été plus accentuées pour les staphylocoques que pour les entérobactériacées; en rapport avec les antibiotiques, on a obtenu de plus grandes différences avec les tablettes de streptomycine, situation qui pourrait être remédiée en augmentant la dose de substance répartie par tablette.

Le calcul de la moyenne des diamètres des zones d'inhibition données par la méthode des tablettes pour les entérobactériacées et staphylocoques, permet d'établir en comparaison avec la méthode d'Erna Lund, le schéma suivant:

	Méthode d'ERNA LUND	*Méthode des tablettes*
Forte sensibilité	minimum 30 mm	minimum 22 mm
Sensibilité modérée	21—29 mm ⌀	14—21 mm ⌀
Résistance relative	16—20 mm ⌀	9—13 mm ⌀
Résistance	en dessous de 15 mm ⌀	en dessous de 9 mm ⌀

Les différences observées entre les aires d'inhibition, obtenues à l'aide des deux méthodes, ont été constantes, ce qui a permis une interprétation correcte de la sensibilité des germes aux antibiotiques ainsi que la constatation d'un concordance entre les deux méthodes.

Afin d'établir la durée de l'efficacité des tablettes, on a étudié 10 souches de staphylocoques à intervalle de 12 mois. Les deux examens n'ont pas mis en évidence des différences en ce qui concerne les dimensions de l'aire d'inhibition, ce qui constitue une preuve que les tablettes gardent leur efficacité au moins pendant un an.

Étant donné ces résultats, la méthode des tablettes peut être recommandée dans la pratique routinière pour la détermination de la sensibilité des germes aux antibiotiques, à condition que les tablettes nécessaires soient mises à la disposition des laboratoires par un sevice spécial de préparation.

CONCLUSIONS

Par l'étude comparative de deux méthodes pour la détermination de la sensibilité des germes aux antibiotiques (Erna Lund et des tablettes) on a obtenu des résultats comparables et constants, à la suite desquels on propose un schéma d'interprétation comparatif.

La méthode des tablettes présente certains avantages (exécution facile, efficacité d'au moins 12 mois) qui permettent de la recommander comme méthode d'antibiogramme dans la pratique de routine.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕННОСТИ ДВУХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕВЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

При сравнительном изучении 2 методов определения чувствительности возбудителей к антибиотикам (метод Э. Лунд и метод таблеток) получались постоянные сходные результаты, на основании чего автор предлагает схему для сравнительной интерпретации.

Метод с использованием таблеток представляет некоторые преимущества (легкость применения, самое меньшее 12 месяцев действенности таблеток), на основании чего этот метод может быть рекомендован в обычной практике для антибиограмм.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN WERT ZWEIER VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER EMPFINDLICHKEIT FÜR ANTIBIOTIKA

ZUSAMMENFASSUNG

Durch vergleichende Untersuchung zweier Verfahren zur Bestimmung der Empfindlichkeit von Keimen für Antibiotika (nach Erna Lund und nach dem Tablettenverfahren) wurden vergleichbare und konstante Ergebnisse erhalten, auf Grund deren ein Schema vergleichender Beurteilung vorgeschlagen wird.

Das Tablettenverfarren bietet gewisse Vorteile (leichte Ausführbarkeit, die Tabletten sind mindestens 12 Monate haltbar), die es gestatten diese Methode für die routinemässige Durchführung des Antibiogramms in der Praxis anzuempfehlen.

INVESTIGATIONS ON THE VALUE OF TWO METHODS OF DETERMINING SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS

SUMMARY

A comparative study of two methods used for the determination of the susceptibility of germs to antibiotics (ERNA LUND's method and the tablet method) showed these methods to yield comparable and constant results on the ground of which a system of comparative interpretation is suggested.

The tablet method has certain advantages (it is readily performed and the tablets may be stored for a period of at least 12 months) owing to which it may be recommended as a routine procedure in the current performance of antibiograms.

LE TAMPON-VÉRONAL, MOYEN D'EXTRACTION DES ANTIGÈNES BACTÉRIENS

NOTE DE LABORATOIRE

par

CELLA BARBER

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Biochimie générale)

— Manuscrit reçu le 24 septembre 1960 —

La réaction de double diffusion en gel d'agar, de plus en plus fréquemment utilisée pour la mise en évidence des relations antigènes-anticorps, est tout aussi efficiente si on utilise comme antigène une suspension de germes ou si l'antigène a été préalablement extrait des bactéries; on obtient parfois un plus grand nombre de lignes de précipitation — révélant donc un nombre plus élevé d'antigènes — dans la réaction entre la suspension bactérienne et l'antisérum homologue, qu'entre le même antisérum et les antigènes isolés par des méthodes courantes (NaOH dil. phénol 45%, phénol 90%, éthylenglycolle, etc.). Des antigènes qui adhérent étroitement aux parois cellulaires ou qui se trouvent à l'intérieur de la cellule, et dont l'extraction présente quelques difficultés, sont aisément mis en évidence par la simple réaction de diffusion en gel entre l'antisérum et les germes homologues.

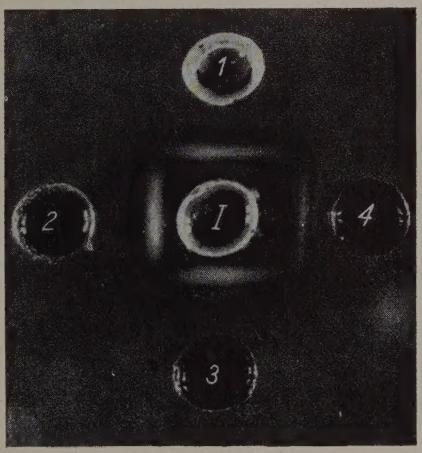


Photo 1. — Réaction de précipitation en gel entre un antisérum charbonneux (12 « R ») I et: *1.* suspension de *B. anthracis; 2.* antigène extrait au tampon véronal; 3. polysaccharide séparé de l'antigène au tampon véronal *4.* antigène extrait d'après la méthode Tomcsik

L'efficience de ces résultats nous a suggéré l'utilisation du tampon véronal (employé à la préparation du milieu gélosé qui sert dans le test de la double diffusion) comme méthode d'extraction des antigènes à partir de germes dont des recherches antérieures ont montré une certaine difficulté à libérer leurs antigènes.

On a soumis aux extractions avec tampon véronal (pH 8,4):

un *bacille anthracis « R »*, un *streptocoque groupe A*, un *staphylocoque*, deux souches de *Klebsiella non-mucoïdes* et une souche de *Bordetella pertussis*. Les germes séchés à l'acétone ont été suspendus en tampon, en concentration de 5 g pour 100 ml, maintenus à 37°, fréquemment agités pendant 48—72 heures.

Après centrifugation des suspensions, les surnageants dialysés ont été testés par des réactions de précipitation en gel vis-à-vis des antisérums homologues, en comparaison avec les suspensions de germes acétonés correspondants.

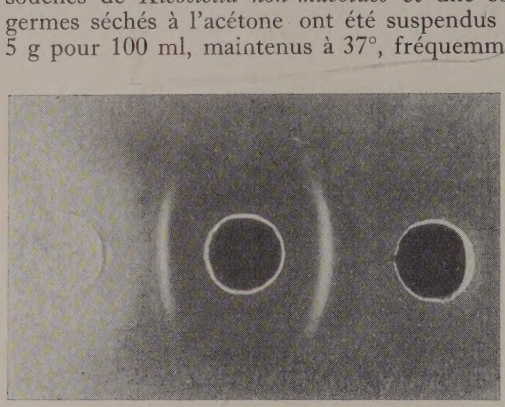


Photo 2. — Réaction de précipitation en gel d'un antisérum staphylococcique avec suspension de germes et antigène extrait au tampon véronal

Les antigènes ont été fractionnés par précipitation à l'acide chlorhydrique dilué, à pH 3,5; après dialyse, les précipités et les surnageants ont été analysés tant du point de vue de leur constitution chimique, que du point de vue réaction sérologique.

On a déterminé par les techniques courantes: l'azote, les acides nucléiques et les glucides. On a effectué la chromatographie des polysaccharides qui généralement restent dans les surnageants des précipitations à pH 3,5.

RÉSULTATS

Tous les antigènes sont des complexes de protéines, nucléoprotéines et polysaccharides; les rendements des antigènes extraits au tampon véronal (pH 8,4) sont importants:

Klebsiella P	Klebsiella 52212	Streptocoque Ny 5	Staphylocoque 80	B. anthracis 12 « R »	B. pertussis
9,70 g %	8,80 g %	6,60 g %	10 g %	12 g %	10 g %

Les germes qui à l'aide d'autres méthodes d'extraction libéraient difficilement leurs polysaccharides, ont permis la diffusion de ces derniers en tampon véronal; ainsi le polysaccharide des parois cellulaires du *b. anthracis « R »*, mis en évidence par chromatographie et dosage des glucides dans le surnageant de l'antigène obtenu par le tampon véronal, après précipitation des protéines à pH 3,5, a été obtenu en quantités plus importantes que par les méthodes utilisées ailleurs (6 g% vis-à-vis de 4,5 g %). Le tampon véronal a également permis la séparation des polysaccharides spécifiques de *Klebsiella non-mucoïdes*, à rendements plus élevés que les méthodes antérieures.

L'antigène extrait à l'aide du tampon véronal d'une *B. pertussis* correspond par le nombre des lignes de précipitation obtenues avec l'antisérum, à un antigène complexe isolé à l'aide du désoxycholate de sodium ayant une grande valeur immunisante, étudié antérieurement; la seule différence constatée est en faveur de l'antigène extrait par le tampon, vu que la centrifugation de la suspension des germes est beaucoup plus aisée dans ce dernier cas.

En conclusion, de six germes différents: un *b. anthracis*, un *staphylocoque*, un *streptocoque*, deux *Klebsiella non-mucoïdes* et une *B. pertussis*, on a isolé par le tampon véronal (pH 8,4) des antigènes complexes avec des rendements importants; la grande solubilité des antigènes bactériens en tampon véronal pourrait expliquer l'obtention du nombre maximum de lignes de précipitation en gel d'agar, entre les suspensions bactériennes et les antisérums homologues.

ПРИМЕНЕНИЕ ВЕРОНАЛОВОГО БУФФЕРА ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ БАКТЕРИЙНЫХ АНТИГЕНОВ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Из 6 различных микробов экстрагировали при помощи вероналового буффера комплексные антигены с высоким выходом; высокая растворимость бактерийных антигенов в вероналовом буффере может служить объяснением факта, что цельные взвеси микробов дали реакции преципитации в геле с соответствующими антисыворотками.

VERONALPUFFERLÖSUNG ALS MITTEL ZUR EXTRAKTION VON BAKTERIENANTIGENEN

ZUSAMMENFASSUNG

Vermittels einer Veronalpufferlösung wurden aus 6 verschiedenen Keimarten komplexe Antigene extrahiert und in hohen Erträgen erhalten. Die grosse Löslichkeit der bakteriellen Antigene in Veronalpuffer könnte das Auftreten von Präzipitationsreaktionen in Gel zwischen Bakterienaufschwemmungen und den entsprechenden Antisera erklären.

VERONAL BUFFER AS A MEANS OF BACTERIAL ANTIGEN EXTRACTION

SUMMARY

Extraction of 6 different germs by means of veronal buffer resulted in considerable yields of complex antigens. The high solubility of bacterial antigens in veronal buffer would account for the precipitation reactions obtained in gels between whole germ suspensions and the corresponding antisera.

Intreprinderea Poligrafică nr. 4, Calea Şerban Vodă, nr. 133 — Bucureşti